
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ DANS L'INFECTION TYPHIQUE EXPÉRIMENTALE

PAR LE D^r BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Depuis que l'attention des bactériologistes a été attirée sur les cytotoxines, l'étude de l'immunité proprement dite, de l'immunité vis-à-vis des microbes, se trouve un peu délaissée.

Les bactéries ont cédé la place aux cellules animales; les sérums — cytolytiques et anticytolytiques — dont le nombre augmente tous les jours, ne visent que les cellules normales de l'organisme. Si captivantes que soient ces recherches en elles-mêmes, il est évident que l'espoir de pénétrer davantage dans l'intimité des phénomènes de défense de l'organisme fut pour beaucoup dans l'enthousiasme soulevé de toutes parts par cette nouvelle orientation de la microbiologie. Certes, les recherches sur les cytotoxines sont loin d'être épuisées, bien que les principaux sérums cytolytiques soient déjà plus ou moins étudiés; il reste encore à accomplir une tâche non moins importante, qui consiste à rechercher tout le parti que l'on pourra en tirer au point de vue thérapeutique.

Mais lorsqu'on se place au point de vue purement théorique, et que l'on cherche à transporter sur le terrain de l'immunité bactérienne les connaissances acquises au sujet des cytotoxines, on voit que l'espoir des bactériologistes n'est pas encore sur le point de se réaliser.

En effet, la notion la plus importante qui domine l'histoire des cytotoxines est celle qui a été mise en évidence par les

belles recherches de M. Bordet, et qui a trait au rôle respectif de l'alexine et de la sensibilisatrice, ou de la *cytase* et du *fixateur*, d'après la terminologie de M. Metchnikoff.

M. Bordet a, en effet, établi dès 1895 que la destruction des vibrions, mis en contact avec le choléra-sérum, est due à l'action simultanée des deux substances, l'alexine et l'anti-corps spécifique. Or, si l'on se propose d'utiliser cette notion, exacte en elle-même, dans le but de rendre les sérums bactéricides plus efficaces, comme le propose le professeur Wassermann, on ne tarde pas à s'apercevoir que l'analogie entre les sérums cytolytiques et bactéricides ne va pas jusqu'à l'identité.

Dans les deux mémoires¹ que M. Wassermann a consacrés à l'exposé de sa théorie alexique ou cytasique de l'immunité, nous trouvons, à côté des considérations théoriques, des faits expérimentaux d'un grand intérêt, destinés à étayer sa théorie.

Avant de passer à l'examen critique de cette dernière, nous nous empressons de déclarer que tous les faits rapportés par l'auteur, avec sa précision coutumière, sont d'une exactitude absolue; nous les avons répétés nombre de fois et toujours avec les résultats indiqués par l'auteur. Nous sommes donc complètement d'accord pour ce qui concerne la partie expérimentale de ses mémoires, mais où nous nous séparons complètement de M. Wassermann, c'est lorsqu'il s'agit d'en tirer des conclusions.

Après avoir analysé le mécanisme des expériences faites par M. Wassermann, et après les avoir complétées par une série d'autres expériences qui vont être exposées plus bas, nous sommes arrivé à des conclusions non seulement différentes, mais presque diamétralement opposées à celles formulées par le savant allemand.

Pour mettre le lecteur à même de s'orienter dans cette question assez complexe et de pouvoir porter son jugement en toute connaissance de cause, il ne sera pas inutile de résumer brièvement les idées de M. Wassermann et les expériences que celles-ci lui ont suggérées. Comme M. Wassermann le dit lui-même à plusieurs reprises, ses idées lui ont été inspirées par les études récentes sur les cytotoxines.

Le premier mémoire traite de l'immunité artificielle, pas-

1. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1900, n° 18; 1901, n° 1.

sive, le deuxième de l'immunité naturelle. L'idée directrice dans ces deux mémoires est la même ; tous deux tendent à faire ressortir l'importance primordiale des alexines ou des cytases dans les deux sortes d'immunité.

*
* *

Pour ce qui concerne l'immunité naturelle, nous savons par les recherches de M. Metchnikoff et de ses élèves au prix de quel effort persévérant la théorie phagocytaire a pu sortir victorieuse de la lutte contre la théorie humorale. M. Wassermann ne tient pas, évidemment, compte des travaux de l'école phagocytaire, et considère la question de l'immunité naturelle comme non encore résolue ; il croit pouvoir la trancher par une expérience qui, d'après lui, est décisive. Voici le raisonnement qui est à la base de cette expérience.

Si, dit-il, l'alexine ou la cytase ne jouait aucun rôle dans l'immunité naturelle, un sérum anticytasique, injecté à l'animal, ne devrait pas affaiblir sa résistance naturelle ; par contre, l'animal doit ressentir l'effet nocif de l'anticytase d'autant plus vivement que la cytase est plus nécessaire pour la défense naturelle de l'organisme.

Or, l'expérience conçue dans cet ordre d'idées démontre que le cobaye dont la cytase naturelle a été neutralisée par une injection intrapéritonéale de l'anticytase, se trouve en état de résistance notablement inférieur à celui d'un témoin qui n'a pas reçu d'anticytase ; d'où M. Wassermann tire cette conclusion, paraissant très logique au premier abord, que « la résistance naturelle de l'organisme est due principalement à la présence de la cytase », et que « les substances diastasiques, se trouvant normalement dans le sang et capables de détruire les bactéries, constituent le principal moyen de défense dans les maladies infectieuses ».

Voilà pour l'immunité naturelle.

Nous allons revenir tout à l'heure sur cette expérience, que nous étudierons en détail ; retenons pour le moment ce fait capital que, d'après M. Wassermann, dans l'immunité naturelle, l'action cytasique ou bactéricide prime tout. L'auteur est à tel point pénétré de ce rôle de la cytase qu'il propose d'introduire dans les usages cliniques le dosage de la cytase, comme cela se pratique pour les autres éléments du sang, l'hémoglobine,

par exemple; il ajoute qu'il serait de la plus haute importance de pouvoir augmenter artificiellement la teneur du sang en cytase. Mais ici nous touchons à la question de l'immunité artificielle, à laquelle M. Wassermann a consacré un très intéressant mémoire, il y a un an environ.

*
* *

Frappé du peu d'efficacité de la plupart des sérums bactéricides (anticholérique, typhique, streptococcique, pneumococcique, charbonneux, etc.), comparativement avec les sérums antitoxiques (antidiphthérique, etc.), M. Wassermann se demande s'il ne serait pas possible de rendre les premiers plus actifs au point de vue thérapeutique.

Ainsi les sérums bactéricides ont l'immense désavantage que voici : si une dose déterminée de sérum est capable de préserver contre un certain nombre de microbes, il n'est pas du tout sûr qu'en triplant, par exemple, la quantité de sérum, on parvienne à préserver l'animal contre une dose trois fois supérieure de microbes; il arrive, au contraire, toujours ceci que, dès que le nombre de microbes dépasse une certaine limite, le sérum bactéricide, quelle qu'en soit la dose injectée, est impuissant à enrayer l'infection : de là l'inefficacité pratique de ces sérums.

M. Wassermann, s'inspirant des connaissances acquises au sujet des cytotoxines, croit avoir trouvé la clef du phénomène : tous nos sérums bactéricides pécheraient, d'après lui, par l'insuffisance en alexines ou en cytases.

En effet, dit-il, depuis les recherches de Bordet, Ehrlich et Morgenroth et d'autres, on sait que les sérums cytolytiques se composent de cytase et de fixateur, ou d'alexine et de sensibilisatrice, d'après l'ancienne nomenclature; la quantité de cytase, au cours de l'immunisation, reste invariable; seul l'élément fixateur (Immunkorper) s'accumule dans le sérum de l'animal vacciné; or, pour qu'un sérum bactéricide puisse être actif, il faut le concours des deux substances, en proportions déterminées, et si l'une d'elles manque, l'action du tout est compromise. Lorsqu'on prépare les sérums bactéricides, on augmente artificiellement la quantité de la substance fixatrice, mais on ne se préoccupe guère d'en faire autant pour la cytase; pour avoir des sérums bactéricides qui agissent, il faut donc leur ajouter de la cytase; ce n'est qu'à cette condition que l'on aura des

sérums réellement efficaces, des sérums qui guérissent; et comme la cytase se trouve dans chaque sérum normal, on n'a, d'après M. Wassermann, qu'à ajouter à des sérums bactéricides du sérum normal. En réalité, la question paraît un peu plus compliquée, car les expériences ont montré à M. Wassermann que tout sérum normal ne convient pas à cet effet, que pour chaque sérum bactéricide il faut établir, selon l'animal qui fournit le sérum, une cytase qui lui convienne, une cytase spécifique, pour ainsi dire; l'auteur reconnaît que le choix de la cytase est une tâche délicate, mais pouvant être de la plus haute importance pour la bactériologie appliquée.

Si la thèse fondamentale de M. Wassermann est conforme à la réalité, on ne s'explique pas bien pourquoi il faut chercher si longuement la cytase appropriée, pourquoi la cytase de l'espèce qui sert à l'immunisation ou bien celle de l'animal qu'il s'agit de protéger ne saurait convenir. Mais ceci n'est qu'un détail; ce qui nous importe avant tout, c'est le principe en vertu duquel un sérum bactéricide est, d'après M. Wassermann, rendu beaucoup plus actif, si on lui ajoute de la cytase appropriée.

Ce savant apporte une expérience, sur laquelle nous reviendrons encore et qui semble en effet confirmer sa thèse.

Nous voyons donc que, d'après le savant allemand, c'est par l'addition de nouvelles quantités de cytases à des sérums bactéricides peu actifs par eux-mêmes que l'on arrive à conférer aux animaux une immunité passive, et c'est également à la présence de la cytase normale du sang que les animaux doivent principalement leur immunité naturelle.

M. Wassermann se rallie donc à la conception humorale de l'immunité, entraîné surtout par ses expériences sur le bacille typhique. Or, si on examine la question de près, on voit que l'auteur ne saurait mieux plaider la cause de la théorie cellulaire qu'en arrêtant son choix sur ce microbe, le bacille d'Eberth étant très peu sensible à l'action directe de la cytase de cobaye. Certes, dans le vaste domaine de l'immunité, il y a des cas particuliers où la cytase mise en liberté à la suite de phagolyse, ou bien injectée à un autre animal sous forme de sérum, peut contribuer à la défense de l'organisme; mais le bacille d'Eberth est précisément un microbe vis-à-vis duquel on n'observe jamais d'action bactéricide directe quelque peu notable.

*
* * *

Revenons à la première expérience de M. Wassermann, ayant pour but de faire ressortir le rôle de la cytase dans l'immunité naturelle.

Il prend deux cobayes; l'un reçoit en injection péritonéale 3 c. c. de sérum chauffé *anticytasique* (antialexique), mélangé à une dose plusieurs fois mortelle de B. typhique; ce sérum est fourni par un lapin injecté plusieurs fois avec du sérum de cobaye.

Un autre cobaye, qui sert de témoin au précédent, reçoit en injection intrapéritonéale 3 c. c. de sérum *normal* de lapin, chauffé comme le précédent, et mélangé avec la même dose de typhique.

Appelons le premier cobaye — *anticytasique*, et le second — *témoin*.

Le lendemain on trouve le cobaye anticytasique mort, tandis que le témoin continue à se porter bien.

Cette expérience ne paraît pas se prêter, à première vue, à des difficultés d'interprétation, et M. Wassermann en a, en effet, conclu sans hésitation que la mort du cobaye anticytasique était due à ce que la cytase naturelle étant paralysée par l'injection de l'anticytase, le cobaye se trouva de la sorte privé de son principal moyen de défense. Or, si l'on étudie de plus près cette expérience, on ne tarde pas à constater qu'elle comporte des conclusions tout à fait différentes.

Qu'est-ce que le sérum anticytasique? Est-il réellement spécifique, comme le croit M. Wassermann, et n'agit-il que sur la cytase?

Nous savons que, dans le cas qui nous intéresse, il a été préparé par injection du sérum de cobaye à un lapin. Mais c'est aussi par injection du sérum de cobaye au lapin que l'on peut obtenir un sérum antileucocytaire; c'est aussi dans les mêmes conditions que l'on obtient un sérum anti-agglutinant contre le pouvoir agglutinant du sérum de cobaye; c'est aussi par le même procédé que l'on obtient le précipité signalé pour la première fois par M. Tschistowitch¹; nous ne parlons que pour mémoire du sérum anticoagulant, décrit récemment², et que l'on

¹ 1. Ces *Annales*, 1899, p. 406.

² 2. L. CAMUS, *Comptes rendus*, 1901, et BORDET et GENGOU, ces *Annales*, 1901, p. 429.

prépare par le même procédé qui a été employé par M. Wassermann pour obtenir le sérum anticytasique.

Il s'ensuit donc que le sérum dont s'est servi M. Wassermann n'est pas seulement dirigé contre la cytase, et on n'a pas le droit de l'appeler plutôt *anticytasique* que *antileucocytaire*, ou *anti-agglutinant*, ou *anticoagulant*, ou *précipitant*.

Ceci posé, il nous reste à examiner la part qui revient dans l'expérience de Wassermann à chacune des propriétés indiquées de ce sérum complexe, dit anticytasique.

*
*
*

Pour cela nous nous n'avons qu'à regarder ce qui se passe dans la cavité péritonéale des deux cobayes de M. Wassermann.

L'exsudat retiré dans la première demi-heure qui suit l'inoculation présente à peu près les mêmes caractères dans les deux cas : il contient relativement peu de microbes, surtout en comparaison avec le nombre de microbes injectés, et extrêmement peu de globules blancs. C'est le stade de la phagolyse.

Déjà au bout d'une demi-heure on peut discerner, entre les deux exsudats, une légère différence qui va en s'accroissant progressivement d'heure en heure. L'exsudat péritonéal du témoin devient de plus en plus riche en leucocytes, comparativement avec celui du cobaye anticytasique. La différence est déjà très nette à partir de la deuxième heure.

Le nombre des microbes pendant les premières heures est sensiblement le même dans les deux cas.

Chez le cobaye témoin, on constate quelquefois, dans le péritoine, quelque rares microbes transformés en boule, mais ceux-ci se perdent dans la masse de microbes intacts.

Ces derniers sont tantôt libres, tantôt réunis en amas plus ou moins considérables.

Chez le cobaye témoin, ces amas se rencontrent plus fréquemment que chez le cobaye anticytasique ; dans le liquide péritonéal de ce dernier, on observe surtout des microbes libres, non agglutinés. Nous en verrons plus tard la raison.

Au bout de deux heures environ apparaît dans le péritoine du cobaye anticytasique un précipité grumeleux, plus ou moins abondant suivant les cas.

Les leucocytes qui commencent à affluer aussi chez le cobaye

anticytasique sont fortement agglutinés ; ils sont accolés les uns aux autres, en formant des groupes de 20, 30 et plus.

Les leucocytes du témoin sont pendant ce temps beaucoup plus nombreux et présentent cette différence, comparativement avec le cobaye anticytasique, qu'ils sont uniformément répartis dans tout l'exsudat, comme c'est le cas dans un exsudat normal.

Il va sans dire que l'exsudat du cobaye témoin ne présente pas la moindre trace du précipité albumineux dont il vient d'être question. Ce précipité peut ne faire son apparition qu'assez tardivement, cela varie avec les sérums ; mais dès qu'il apparaît, il revêt la même disposition que les leucocytes. Que ceux-ci soient à l'état isolé ou qu'ils soient agglomérés en amas, ce qui est le cas de beaucoup le plus fréquent, ce précipité s'accumule tout autour des leucocytes, en les noyant dans son épaisseur.

C'est pendant les deux ou trois premières heures qui suivent l'inoculation que se décide le sort de l'animal. Lorsqu'on examine en ce moment l'exsudat péritonéal sur des lames colorées, on constate une phagocytose très prononcée chez le cobaye témoin, tandis que, chez le cobaye anticytasique, elle est à peine ébauchée.

Mais ce n'est pas tant dans le liquide péritonéal lui-même que se décide la question de la vie et de la mort de l'animal ; c'est au niveau de l'épiploon que la lutte est au plus fort.

Déjà un examen rapide d'un frottis d'épiploon, fait une heure après l'injection, ne laisse subsister aucun doute sur l'issue de l'expérience ; car c'est au niveau de l'épiploon que se donnent rendez-vous, d'une part, la plus grande partie des microbes et, d'autre part, la majorité des leucocytes dont dispose le péritoine.

Rarement il nous a été donné d'observer une phagocytose aussi intense que celle qui a lieu au niveau de l'épiploon chez le cobaye témoin, une heure après l'injection du mélange du typhique et du sérum normal : les leucocytes regorgent de microbes ; ils les phagocytent par douzaines à la fois.

Or, rien de pareil sur l'épiploon chez l'autre cobaye, l'anticytasique : à côté de rares leucocytes renfermant le B. typhique, nous voyons que la grande majorité des bactéries sont hors des cellules.

Ajoutons que la forme primitive du microbe est dans tous

les cas conservée, et cela même chez le cobaye témoin ; même à l'intérieur des phagocytes, le B. typhique garde sa forme caractéristique en bâtonnet.

Tels sont les faits que l'on observe au microscope chaque fois que l'on réalise l'expérience de Wassermann.

Maintenant nous sommes assez renseigné pour pouvoir juger quelle est la part qui revient à chacune des propriétés que possède le sérum dit anticytasique.

*
* *

Le sérum employé par M. Wassermann, si on en juge d'après ses indications, a été fortement *anticytasique*. Celui que nous avons employé a été, au début, deux fois moins actif, c'est-à-dire qu'il ne pouvait neutraliser qu'une quantité de cytase deux fois moindre ; mais plus tard, au fur et à mesure que nos animaux devenaient plus immunisés, notre sérum ne cédait en rien par sa teneur en anticytase à celui de M. Wassermann. Or, chose curieuse, notre premier sérum, qui n'était que faiblement anticytasique, nous a donné d'aussi bons résultats que celui que nous employâmes ultérieurement.

Ceci faisait déjà présumer que la cytase ne devait pas jouer un rôle prépondérant dans l'expérience de M. Wassermann.

Mais ce qui nous prouva surtout, et d'une façon positive, que le sérum en question doit agir autrement que par sa propriété anticytasique, c'est que, à l'examen microscopique, nous n'avons presque jamais constaté d'action bactéricide *in vivo*.

Supposons en effet pour un instant que le sérum de M. Wassermann tue le cobaye parce qu'il neutralise la cytase de ce dernier, comme le croit M. Wassermann ; mais alors il faut nécessairement conclure, pour être logique, que le cobaye témoin, injecté de sérum normal, doit entièrement la vie à sa cytase libre, qui exerce une action bactéricide sur le bacille typhique. Or, quand on examine le liquide péritonéal du cobaye témoin, on n'y trouve que de temps à autre quelques microbes présentant une altération morphologique : ces microbes altérés sont extrêmement rares, surtout si on tient compte du nombre incalculable de microbes injectés, qui n'ont subi aucune influence cytasique ; il s'ensuit donc que cette influence, dans les cas où elle existe, car elle n'existe pas toujours, doit être

extrêmement restreinte, et son rôle dans le phénomène de Wassermann doit être des plus insignifiants.

D'ailleurs, l'expérience *in vitro* montre que la cytase de cobaye, c'est-à-dire le sérum normal, non chauffé, n'est nullement bactéricide pour le bacille d'Eberth : ce dernier y pousse aussi bien que dans du bouillon ordinaire.

Voici encore une autre expérience qui parle dans le même sens.

Préparons un mélange composé de 3 c. c. de sérum normal (cytase) de cobaye et d'une demi-culture de typhique¹; ce sont là les mêmes proportions que nous avons employées pour l'expérience de M. Wassermann; injectons de suite ce mélange dans la cavité péritonéale d'un cobaye normal, sans addition de sérum anticytasique; le lendemain nous trouverons ce cobaye mort, comme si le sérum de cobaye n'avait pas été ajouté. Ceci prouve que la cytase de cobaye, présentée ici sous forme de 3 c. c. de sérum, et la cytase naturelle que possède déjà le cobaye, réunies ensemble, sont tout de même incapables d'arrêter l'infection.

Ce cobaye meurt donc, bien qu'il possède dans son péritoine beaucoup plus de cytase que n'en avait le cobaye témoin de l'expérience de M. Wassermann, lequel survit à la même dose du bacille typhique.

Il est donc évident que ce n'est pas la cytase qui sauve le cobaye témoin de M. Wassermann et qui intervient dans la lutte contre le typhique; ce n'est pas, par conséquent, l'anticytase qui empêche la lutte contre le bacille typhique et qui fait tort à l'autre cobaye que nous sommes convenu d'appeler anticytasique.

Si ce dernier meurt à la suite d'injection du sérum complexe dont s'est servi M. Wassermann, c'est que ce sérum agit ou bien comme *antiphagocytaire*, ou bien comme *anti-agglutinant*, ou bien comme *précipitant*, ou bien par ces trois propriétés réunies.

Avant de passer à l'étude de ces différentes actions, nous

1. Dans toutes nos expériences, la dose du bacille typhique a été la même et égale à 1/2 culture de 24 heures sur gélose; la quantité de sérum a été toujours la même: 3 c. c. Une demi-culture du typhique représentait une dose cinq fois mortelle; elle tuait un cobaye de 500 grammes en 18-24 heures. Cette culture provient de la collection de notre collègue, M. Binot, auquel nous sommes heureux d'exprimer ici nos très vifs remerciements.

tenons à faire une remarque au sujet de l'expérience que nous venons de décrire. Pour que l'expérience réussisse, il faut que le mélange du sérum de cobaye et du bacille typhique soit injecté aussitôt fait; car, lorsqu'on laisse séjourner quelque temps ce mélange dans le verre, avant de l'injecter, il peut ne plus tuer; ce n'est pas parce que le sérum de cobaye a eu le temps d'exercer son action bactéricide sur le typhique, mais parce qu'il vient s'ajouter un autre phénomène tout différent, sur lequel nous reviendrons ultérieurement.

Cette réserve faite, passons à l'examen d'une autre propriété du sérum de M. Wassermann, la propriété *anti-agglutinante*.

*
* *

L'agglutination joue un rôle assez considérable dans l'histoire du bacille typhique : nous verrons plus bas qu'un bacille d'Eberth à l'état agglutiné agit différemment d'un bacille d'Eberth non agglutiné. Il était donc tout naturel de nous demander si le sérum, dit anticytasique, serait funeste au cobaye par le fait qu'il empêche le sérum de cobaye d'agglutiner le *B. typhique*.

Par des expériences appropriées *in vitro*, nous nous sommes assuré que le sérum obtenu par le procédé de Wassermann empêche réellement le sérum de cobaye d'agglutiner le bacille typhique.

Mais, étant donnée la faible quantité d'exsudat contenu dans le péritoine, il était à prévoir que ce pouvoir anti-agglutinant ne devait pas avoir des conséquences importantes au point de vue de l'immunité.

En effet, lorsqu'on examine comparativement les exsudats des deux cobayes, témoin et anticytasique, on constate, comme nous l'avons noté, en passant, plus haut, que dans l'exsudat du cobaye anticytasique il y a moins d'amas de microbes agglutinés que dans celui du cobaye témoin; mais cette différence, bien que très nette et même plus nette que l'action bactéricide, cytasique, n'est pas cependant assez profonde pour pouvoir causer à elle seule la mort du cobaye anticytasique.

*
* *

Il nous reste à examiner la propriété *précipitante* et la pro-

priété *antileucocytaire* du sérum de M. Wassermann. Ces deux propriétés, bien que dirigées contre des éléments différents du sang, contribuent cependant au même but, qui est d'empêcher l'action phagocytaire.

Lorsqu'on fait un mélange *in vitro* de sérum de cobaye normal avec du sérum d'un lapin, qui a été injecté plusieurs fois avec du sérum de cobaye, on voit se produire un précipité granuleux et assez abondant : ce phénomène, décrit pour la première fois par M. Tchistowitch, peut être plus ou moins prononcé pour des raisons qui nous échappent encore.

Le même phénomène se produit *in vivo*, dans le péritoine du cobaye auquel on vient injecter du sérum de lapin préparé comme il a été indiqué.

Dès que ce précipité apparaît, il commence par emprisonner les leucocytes dans la masse de ses fines granulations ; il empêche naturellement les leucocytes de se mouvoir librement, et paralyse ainsi jusqu'à un certain degré leur activité phagocytaire.

Mais cette dernière trouve une entrave autrement importante dans la propriété nettement *antiphagocytaire* du sérum de M. Wassermann.

Ce sérum n'est pas leucotoxique, au sens propre du terme ; il ne peut pas dissoudre les globules blancs, étant préalablement chauffé à 60° ; mais il reste fortement agglutinant vis-à-vis des leucocytes.

En décrivant l'aspect microscopique de l'exsudat péritonéal du cobaye anticytasique, nous avons attiré l'attention du lecteur précisément sur la présence des paquets de leucocytes accolés les uns aux autres, dont le nombre variait et allait jusqu'à 20, 30, 40 et plus par paquet.

Des leucocytes ainsi agglutinés sont évidemment hors d'état de remplir leurs fonctions phagocytaires.

Mais ce n'est pas encore tout.

A côté de cette action visible, se traduisant par l'agglutination des leucocytes, le sérum en question exerce, en plus, une action directe, paralysante sur chaque leucocyte, en tant que phagocyte. Cette action que nous ne pouvons pas apprécier à l'œil, puisqu'elle n'amène pas de modifications morphologiques, existe incontestablement ; car autrement, comment expliquer

que, chez le cobaye anticytasique, au niveau de l'épiploon, des leucocytes, même isolés, non agglutinés, refusent de phagocyter les microbes qui se trouvent tout à côté d'eux, à la portée de leurs pseudopodes.

Il faut donc que le sérum, en plus de son action mécanique, exerce sur les globules blancs encore une autre action que nous ne pouvons désigner mieux qu'en l'appelant antiphagocytaire.

Il suffit de nous reporter aux phénomènes constatés dans le péritoine des deux cobayes de M. Wassermann, pour voir jusqu'à quel degré cette influence antiphagocytaire est manifeste chez le cobaye anticytasique, et jusqu'à quel point le manque de la phagocytose chez ce dernier contraste avec la phagocytose intense chez le cobaye témoin.

Si donc on avait à faire un choix entre les différents noms à donner au sérum employé dans l'expérience de M. Wassermann, ce n'est pas certainement celui d'anticytasique, mais c'est celui d'antiphagocytaire qui traduirait le mieux le caractère dominant dans l'expérience en question.

*
**

Il nous reste à dire quelques mots du cobaye témoin qui reçoit un mélange du B. typhique et du sérum (3 c. c.) chauffé de lapin normal.

Ce cobaye, qui reçoit dans l'expérience de M. Wassermann une dose 40 fois mortelle, et dans nos expériences toujours une dose cinq fois mortelle¹, et qui malgré cela reste en bonne santé, n'est pas, évidemment, un témoin banal. M. Wassermann attribue cette résistance à l'action stimulante du sérum normal, injecté en même temps que les microbes; il ajoute que des phénomènes analogues ont été observés pour d'autres microbes par M. Metchnikoff, Isaëff et Pfeiffer. Je me permettrai de faire à ce sujet une petite rectification.

Les auteurs cités par le savant allemand ont vu en effet qu'un cobaye auquel on injecte dans le péritoine du sérum *normal* d'un autre animal résiste le *lendemain*, c'est-à-dire 24 heures après, à une dose simplement ou plusieurs fois mortelle de microbes (choléra, typhique, etc.)

Or, dans l'expérience de M. Wassermann, il s'agit du sérum

1. La dose mortelle fut 1/40 d'anse.

non normal, mais *chauffé*, injecté non la veille, mais *simultanément* avec les microbes.

Le mécanisme par lequel agissent les sérums, dans les deux cas, peut donc ne pas être le même.

Déjà depuis longtemps notre attention a été attirée sur les propriétés stimulantes des sérums chauffés : ainsi, par exemple, dans des expériences encore inédites sur le charbon, nous avons remarqué qu'en préparant les animaux avec du sérum chauffé, on obtient une résistance beaucoup plus marquée qu'avec le même sérum non chauffé.

Faisons remarquer en passant que ce fait prouve que, dans certains cas, l'absence de l'alexine, ou de la cytase, loin d'être préjudiciable à l'animal, est plutôt utile ; et voici pourquoi, pensons-nous : en chauffant le sérum à 55°, nous supprimons la cytase qui exerce une action toxique vis-à-vis des cellules et notamment vis-à-vis des globules blancs et rouges de l'animal qui reçoit l'injection ; quant à la propriété stimulante, inhérente au sérum injecté, le chauffage à 55° la laisse complètement intacte.

Voilà pourquoi un sérum chauffé est préférable au sérum non chauffé, lorsqu'on se propose de stimuler, par une injection faite 24 heures avant, la défense naturelle de l'organisme. Nos expériences à ce sujet n'ont été ni assez nombreuses ni assez variées pour que nous puissions affirmer que ce soit là une règle générale pour tous les microbes ; mais elle est sûrement applicable à un certain nombre d'entre eux (charbon, typhique, coli¹).

Jusqu'à présent il a été question de l'action du sérum injecté la veille de l'inoculation microbienne. Il a fallu voir comment agit un sérum injecté simultanément avec les microbes.

Les expériences faites à ce sujet avec différents microbes nous ont montré que l'effet stimulant du sérum est d'autant plus faible que l'on se rapproche plus du moment d'inoculation des microbes, mais que cet effet existe encore sûrement dans le cas où l'on injecte simultanément sérum et microbes.

Que le sérum normal du lapin, chauffé, injecté au cobaye témoin dans l'expérience de M. Wassermann, exerce réellement

1. L'action du sérum chauffé vis-à-vis du coli a été constaté par le Dr Petit dans le laboratoire de M. Metchnikoff.

une action stimulante sur les leucocytes, c'est ce qui ressort de la comparaison de l'exsudat de ce cobaye avec celui du cobaye anticytasique. Tandis que chez ce dernier, les leucocytes arrivaient dans le péritoine lentement, en petit nombre, chez le premier, par contre, l'afflux leucocytaire se faisait rapidement et atteignait bientôt un chiffre assez élevé.

Nous avons pensé d'abord que cette différence était due à ce que, dans un cas, l'infection évolue librement, sans entraves, tandis que, dans l'autre, elle est aussitôt jugulée; qu'il y a, en d'autres termes, chimiotaxie positive dans le second, et chimiotaxie négative dans le premier, sous l'influence du *B. typhique*.

Or, cette hypothèse est inexacte. Il suffit d'injecter à deux cobayes, au lieu du bacille typhique, de la poudre de carmin mélangée respectivement avec du sérum anticytasique et du sérum normal, tous les deux chauffés, pour constater la même différence au point de vue leucocytaire et quant à la façon dont les leucocytes se conduisent dans les deux cas vis-à-vis du carmin.

Chez le cobaye anticytasique, les grains de carmin se trouvent en majeure partie en dehors des cellules, et cela aussi bien dans le liquide péritonéal qu'au niveau de l'épiploon; chez le cobaye injecté avec du sérum normal, le carmin extracellulaire est l'exception; il est tout entier tantôt englobé à l'intérieur de leucocytes, si les grains sont petits, tantôt entouré de nombreux leucocytes, lorsque les grains sont volumineux; la phagocytose est au maximum au niveau de l'épiploon, tout comme dans le cas des bacilles typhiques.

Il faut donc en conclure que c'est bien aux propriétés mêmes des deux sérums en question qu'est due la différence dans la réaction phagocytaire des deux cobayes de M. Wassermann. Si on injecte en même temps à un troisième cobaye un mélange de carmin et du sérum chauffé d'un cobaye, on voit que la réaction phagocytaire dans le péritoine de ce dernier a été notablement moins prononcée que dans le témoin, injecté du sérum de lapin normal.

Il est donc certain que le sérum normal chauffé de lapin, injecté dans le péritoine du témoin, après avoir été mélangé avec le typhique, agit d'une façon stimulante sur le cobaye et permet

à celui-ci de supporter facilement une dose mortelle et même plusieurs fois mortelle du bacille typhique.

Mais il faut aussi tenir compte de ce fait que la stimulation, dans les cas d'injection simultanée du sérum et des microbes, n'a pas le temps nécessaire pour développer toute son action; elle est nécessairement inférieure à celle qui peut être obtenue après injection du sérum faite la veille; et puisque le cobaye témoin de M. Wassermann est capable de supporter dans ces conditions une dose de culture typhique quarante fois mortelle, cela ne peut pas être exclusivement à la faveur de l'action stimulante du sérum ajouté à la culture, comme le croit M. Wassermann.

Ce qui permet au cobaye témoin de supporter impunément une dose quarante fois mortelle, c'est que le sérum de lapin agit directement sur le B. typhique, et, avant que celui-ci soit injecté dans le péritoine, il est déjà immobilisé et agglutiné dans le verre d'expérience; le bacille typhique arrive dans le péritoine non pas à l'état de microbes libres, mobiles, mais modifié, sous forme d'amas plus ou moins considérables.

Mais s'il en est ainsi, nous dira-t-on, l'agglutination doit intervenir aussi chez l'autre cobaye, l'anticytasique, puisque le sérum anticytasique n'est autre qu'un sérum de lapin, et, comme tel, il doit immobiliser et agglutiner les bacilles typhiques.

Et il les immobilise et les agglutine effectivement.

Mais tandis que le sérum normal de lapin, injecté au témoin, agglutine les bacilles typhiques, puis les fait phagocyter énergiquement grâce à sa stimuline, le sérum anticytasique, par contre, ne fait qu'agglutiner les microbes, puis, en raison de son action antiphagocytaire, s'oppose à ce qu'ils soient englobés. Ce cobaye anticytasique ne peut donc pas bénéficier du fait de l'agglutination, ses leucocytes étant empêchés dans leurs fonctions phagocytaires; tandis que le témoin dont les leucocytes sont excités par le sérum normal profite largement de l'agglutination, et supporte grâce à cela des doses énormes de microbes.

II

Nous avons déjà exposé au commencement de cet article les lignes générales du second mémoire de M. Wassermann, dans

lequel l'auteur émet cette idée qu'il faudrait, pour rendre les sérums bactéricides plus actifs, leur ajouter une cytase appropriée.

Voici l'expérience sur laquelle M. Wassermann base sa thèse :

Il a un sérum antityphique dont 1 m. m. c. préserve le cobaye contre une anse de bacilles typhiques très virulents; si, au lieu d'une anse, il en injecte trois, il n'arrive pas à sauver le cobaye: quelle que soit la quantité de sérum, le cobaye succombe invariablement à cette dose. Mais, si l'auteur ajoute à son sérum antityphique du sérum normal de bœuf, le cobaye survit à la dose indiquée du bacille typhique.

D'après M. Wassermann, la survie du cobaye est due à ce qu'il a fait intervenir, concurremment avec la sensibilisatrice, ou fixateur, renfermée dans le sérum antityphique, la cytase spécifique, qui est, dans le cas présent, représentée par le sérum normal de bœuf.

Il est à peine besoin d'ajouter que l'auteur s'est assuré que le sérum normal de bœuf, à lui tout seul, est incapable de produire cet effet.

Nous regrettons vivement de n'avoir pas pu reproduire, faute de sérum antityphique, cette expérience sous la forme même que lui a donnée l'auteur; la précision que ce savant apporte toujours dans ses expériences nous répond de son exactitude absolue.

Du reste, quelques expériences, faites dans un sens un peu différent de celui qui a guidé l'auteur, ne laissent aucun doute sur la réalité du fait très intéressant observé par M. Wassermann. Mais pour ce qui concerne la façon dont l'auteur interprète son expérience, nous nous permettrons de faire des réserves.

M. Wassermann aurait pu cependant facilement entraîner notre conviction et nous faire partager ses idées, en faisant une expérience de contrôle, pourtant très simple.

Puisqu'il veut démontrer que c'est l'addition de l'*alexine* ou de la *cytase* de bœuf au sérum antityphique, qui permet à son cobaye de survivre à trois anses de B. typhique, il n'avait qu'à compléter son expérience par une autre ainsi conçue : au lieu d'ajouter du sérum de bœuf normal, contenant la cytase, il aurait dû essayer d'ajouter du sérum de bœuf chauffé à 55°,

c'est-à-dire du sérum qui ne diffère précisément du premier que par l'absence de la cytase.

Si l'addition du sérum de bœuf, privé de sa cytase, s'était montrée incapable de préserver le cobaye, nous aurions eu la preuve irréfutable que c'est bien la cytase, et pas autre chose, qui sauve l'animal.

Mais tant que cette expérience ne sera pas faite, nous nous permettrons de ne pas partager l'opinion de l'auteur; nous exposerons plus bas certaines raisons de croire que le sérum chauffé de bœuf aurait produit le même effet, dans l'expérience de M. Wassermann, que le sérum non chauffé, si ce n'est encore un effet meilleur.

*
* *

Il y a deux manières de favoriser la phagocytose : on peut exciter directement les globules blancs jusqu'à leur maximum d'activité; on peut aussi mettre à la disposition des phagocytes des microbes plus ou moins atteints dans leur vitalité.

Si un phagocyte est capable d'englober et de digérer un nombre donné de bacilles typhiques, par exemple, lorsque ceux-ci ont leurs mouvements libres, il est tout naturel qu'il soit capable de phagocyter avec succès un nombre supérieur de ces mêmes bacilles typhiques si on leur enlève la mobilité, et avec cela la possibilité de fuir les leucocytes.

C'est ce que l'on observe quand on mélange *in vitro* les bacilles typhiques avec certains sérums normaux chauffés ou non chauffés, et qu'on injecte le mélange dans le péritoine du cobaye.

Lorsqu'on examine en goutte suspendue les bacilles typhiques ayant été en contact avec du sérum, on constate que les bacilles, qui tantôt se déplaçaient librement dans le champ, s'immobilisent en grande partie; ils s'accrochent les uns aux autres, forment des amas de plus en plus gros et finissent par constituer un bloc entier de microbes, qui sont comme figés sur place.

Bref, nous assistons là à un phénomène d'immobilisation, suivie d'agglutination, comparable au point de vue morphologique à celui que déterminent les sérums spécifiques.

Tous les sérums normaux n'agglutinent pas le typhique avec

la même intensité. En prenant pour base la rapidité d'apparition de l'agglutination, on peut construire toute une échelle de sérums de forces agglutinantes croissantes.

Afin d'éliminer l'intervention de la cytase, nous avons l'habitude d'opérer toujours, sauf avis contraire, sur des sérums chauffés à 55°-56°, température à laquelle le pouvoir agglutinant reste généralement intact.

Nous avons eu à notre disposition une dizaine de sérums environ, provenant d'animaux de laboratoire ou de boucherie; or c'est celui de bœuf qui s'est montré le plus agglutinant, ou pour mieux dire, le plus rapidement agglutinant; déjà quelques instants après l'addition de ce sérum à l'émulsion du B. typhique, l'immobilisation et l'agglutination sont bien avancées.

Le sérum chauffé de lapin agglutine aussi rapidement, mais cependant un peu moins que le sérum de bœuf. Le sérum qui dans nos expériences s'est montré le moins doué du pouvoir agglutinant est celui de cobaye, lorsqu'on le chauffait à 58°.

Or, que fait-on lorsqu'on ajoute à une émulsion de bacilles typhiques du sérum chauffé de lapin, par exemple, et que l'on injecte ensuite le mélange dans la cavité péritonéale du cobaye? En injectant ce mélange, on réalise les deux conditions essentielles qui favorisent le travail phagocytaire : par la propriété stimulante du sérum, ce mélange agit sur les leucocytes en leur demandant un surcroît d'activité; en plus, en vertu de l'action du sérum sur les microbes, ce mélange ne contient que des bactéries immobilisées, paralysées, se défendant mal contre les phagocytes.

Il est dès lors clair que le concours de ces deux facteurs fait que le cobaye supporte dans ces conditions des doses énormes de microbes.

Il est difficile de dissocier ces deux facteurs dans un sérum chauffé, et de déterminer la part qui revient à la stimuline et celle qui revient à l'action directe sur les microbes, de ce que nous appellerions volontiers immobilisine.

Seul, ce dernier facteur, de même que l'agglutinine, se prête à un dosage relativement précis et facile. Or en ne tenant compte que du pouvoir immobilisant et agglutinant, nous avons observé que plus il est prononcé, mieux le cobaye supporte des doses considérables du B. typhique.

Ainsi, on obtient toujours d'excellents résultats en injectant au cobaye le mélange du B. typhique (1/2 culture de 24 heures, sur gélose) et du sérum chauffé de lapin (3 c. c.).

Le sérum chauffé de bœuf qui, comme nous venons de le dire, immobilise et agglutine le B. typhique encore plus rapidement, peut donner une survie très notable ou définitive, même si on en injecte 20-25 minutes après que le bacille typhique a été inoculé.

Il en est tout à fait autrement pour le sérum chauffé de cobaye qui, lui, n'agglutine le B. typhique que très tardivement ; le mélange du B. typhique et du sérum chauffé de cobaye, fait dans les mêmes proportions que plus haut, tue le cobaye dans les 24 heures.

Le sérum de cobaye normal, non chauffé, agglutine beaucoup mieux que le même sérum chauffé, mais notablement moins que le sérum chauffé de lapin.

Or, lorsqu'on injecte le mélange du B. typhique avec le sérum non chauffé de cobaye, on obtient des résultats contradictoires à première vue, mais qui en réalité s'expliquent facilement, dès qu'on est prévenu : chaque fois que l'on injecte le mélange en question aussitôt qu'il est préparé, c'est-à-dire avant que l'agglutination ait pu se faire dans le verre, la mort du cobaye est certaine. Mais il suffit de laisser ce même mélange dans le verre d'expérience pendant quelque temps, une demi-heure au plus, pour que ce mélange devienne aussi inoffensif que celui fait avec du sérum de lapin ou de bœuf.

Voici une expérience qui le prouve d'une façon nette : nous mélangeons dans un verre à pied une double dose de sérum normal de cobaye (6 c. c.) avec une double dose de B. typhique (une culture entière) ; une moitié du contenu du verre est injectée à un cobaye aussitôt que le mélange est fait ; l'autre moitié est injectée à un autre cobaye du même poids, après une demi-heure de séjour dans le verre. Le premier cobaye meurt dans les 24 heures ; l'autre continue à vivre et se trouve déjà complètement rétabli le lendemain de l'inoculation.

Ce n'est donc pas tant le sérum de tel ou tel autre animal qui intervient dans le fait de la survie du cobaye, que l'état plus ou moins avancé d'agglutination que présentent les bacilles typhiques au moment où ils arrivent dans la cavité péritonéale

du cobaye ; il existe donc deux facteurs, l'action stimulante du sérum et le pouvoir agglutinant, auxquels est due la survie du cobaye.

Le rôle de l'agglutination et de la stimulation dans l'infection typhique peut être démontré encore d'une autre façon.

En soumettant des sérums qui sont naturellement très agglutinants, à un chauffage prolongé, on atténue leur pouvoir agglutinant, de même que leur pouvoir stimulant. Ainsi, quand on chauffe le sérum de lapin à 70° pendant deux heures, on retarde notablement l'apparition de l'agglutination ; eh bien, un sérum de lapin, ainsi chauffé, étant mélangé à la dose ordinaire (1/2 culture) du B. typhique, ne préserve pas l'animal de la mort.

Dans une autre expérience, nous avons chauffé du sérum de bœuf pendant deux nuits consécutives à 56° ; ce sérum, mélangé au B. typhique, s'est montré aussi peu efficace que le sérum chauffé de cobaye.

Il résulte de l'ensemble des faits exposés qu'il existe des rapports directs incontestables entre l'état agglutiné du microbe et le pouvoir stimulant du sérum, d'une part, et la facilité avec laquelle le cobaye supporte l'infection, d'autre part.

Nous ne saurions trop insister sur ce fait que la survie du cobaye est au prix de ces deux facteurs agissant concurremment. L'agglutination seule des microbes est impuissante à assurer la vie du cobaye, si elle n'est pas suivie de réaction phagocytaire.

Reportons-nous maintenant à l'expérience de M. Wassermann : lorsqu'il ajoute à son sérum antityphique, qui, à lui seul, est impuissant à préserver le cobaye contre trois anses de B. typhique, encore du sérum normal de bœuf, soit de la *cytase* de bœuf, le cobaye survit.

Après tout ce que nous avons vu au sujet de l'agglutination et de son importance dans l'infection typhique, on peut se demander si le cobaye de M. Wassermann n'aurait pas survécu, après avoir reçu du sérum chauffé de bœuf ; on peut se demander, en d'autres termes, si la survie du cobaye, dans l'expérience de M. Wassermann, est due à la présence de la cytase ou à l'action très agglutinante, vis-à-vis du B. typhique, d'un sérum tel que le sérum de bœuf,

Peut-être le résultat serait-il même plus frappant, si M. Wassermann s'était servi du sérum de bœuf, non alexique, c'est à-dire chauffé; car le sérum de bœuf normal, non chauffé, comme l'a d'ailleurs très bien vu M. Wassermann, est déjà toxique par lui-même; tandis que le sérum de bœuf chauffé ne l'est pas aux doses employées; il présente, en plus, l'avantage d'avoir un pouvoir agglutinant aussi fort que le sérum non chauffé, et d'exercer une action favorable, stimulante sur le système phagocytaire.

*
* *

CONCLUSIONS :

L'immunité naturelle¹ du cobaye vis-à-vis du B. typhique n'est pas due à l'action bactéricide de sa cytase (alexine).

Le sérum anticytasique possède d'autres propriétés que celle de neutraliser la cytase.

De toutes ces propriétés, c'est celle de paralyser les fonctions phagocytaires qui occupe la première place dans l'expérience de M. Wassermann.

L'immunité naturelle du cobaye vis-à-vis du B. typhique rentre dans les lois générales de la doctrine phagocytaire.

Les sérums chauffés exercent une action stimulante sur l'organisme déjà peu de temps après qu'ils sont injectés.

La plupart des sérums chauffés d'animaux normaux exercent un pouvoir agglutinant sur le B. typhique.

Les bacilles typhiques agglutinés par les sérums normaux sont mieux phagocytés et peuvent être injectés à des doses beaucoup plus élevées que les bacilles non agglutinés; mais les bacilles typhiques, bien que très agglutinés, tuent le cobaye chaque fois que l'on empêche la phagocytose.

La théorie de M. Wassermann sur l'effet de l'addition de cytases à des sérums bactéricides ne semble pas suffisamment démontrée; pour ce qui concerne le B. typhique, le rôle attribué à la cytase serait peut-être dû à l'action fortement agglutinante du sérum de bœuf vis-à-vis de B. typhique.

1. Nous parlons au cours de ce travail de l'« immunité naturelle » chaque fois qu'il s'agit du cobaye témoin qui reçoit du sérum normal de lapin; nous le faisons simplement pour nous conformer à la terminologie de M. Wassermann; en réalité, ce cobaye possède plus que l'immunité naturelle.

En terminant nous voudrions attirer l'attention sur la possibilité de tirer quelque profit en pratique de l'emploi des sérums chauffés.

On sait depuis les travaux de M. Issaëff, de M. Metchnikoff et de ses élèves, que l'injection intrapéritonéale de sérum normal, faite à un cobaye 24 heures avant celle de microbes (choléra, typhique, etc.), peut préserver contre la dose deux fois et même plusieurs fois mortelle de ces microbes. Nous avons vu que le sérum chauffé produit le même effet que le sérum non chauffé, sans en présenter les inconvénients.

M. Metchnikoff s'est demandé déjà depuis longtemps, si on ne pouvait pas faire profiter certaines opérations chirurgicales de l'effet stimulant produit par les sérums normaux, et augmenter de la sorte la résistance naturelle du péritoine humain¹.

Après avoir constaté l'effet stimulant immédiat, déterminé par les sérums chauffés, d'une part, et leur effet agglutinant qui facilite tant le travail phagocytaire, nous nous demandons s'il ne serait pas utile de pratiquer, après chaque intervention portant sur le péritoine, une sorte de lavage de la cavité péritonéale par du sérum chauffé de bœuf ou de cheval. En versant dans le péritoine, après l'opération, une certaine quantité de sérum chauffé à 55°, on pourra pour ainsi dire balayer, par le fait de l'agglutination, les microbes (staphylocoque, par exemple) qui se prêtent à l'agglutination par les sérums normaux, et en même temps on agira directement sur les phagocytes du péritoine en les forçant à donner le maximum de leur pouvoir digestif vis-à-vis des microbes agglutinés et même non agglutinés.

1. Un des élèves de M. Metchnikoff, le docteur R. Petit, fait actuellement des recherches dans cet ordre d'idées.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ORIGINE DE L'ALEXINE DES SÉRUMS NORMAUX

PAR LE D^r OCTAVE GENGOU, DE LIÉGE.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

DEUXIÈME PARTIE.

L'alexine des sérums normaux est-elle un produit de sécrétion des globules blancs?

Après avoir renoncé, à la suite de ses propres recherches, à la théorie purement humorale, M. Buchner accepta l'origine leucocytaire de l'alexine du sérum, mais fit de celle-ci une substance sécrétée par les globules blancs vivants. Tout en ne niant pas, de la sorte, le rôle que M. Metchnikoff fait jouer aux phagocytes, dans la défense de l'organisme, M. Buchner laisse toutefois à l'élément liquide du sang, collecteur de l'alexine leucocytaire, une action prépondérante dans l'immunité; la phagocytose, dès lors, n'est tout au plus qu'un moyen de défense d'importance égale au pouvoir bactéricide des humeurs. Au contraire, M. Metchnikoff ne peut admettre ce libre passage dans le sang de l'alexine du leucocyte bien vivant; pour lui le plasma sanguin n'est pas bactéricide, et la lutte contre les microbes chez l'animal neuf revient tout entière aux globules blancs.

On a cherché de divers côtés à résoudre ce problème, par des moyens différents, qui tous n'ont fait qu'approcher la question, rendant telle ou telle solution plus ou moins probable, sans avoir jamais apporté la preuve certaine que, tel qu'il circule dans les vaisseaux, le plasma sanguin ne contient pas d'alexine.

1. Voir ces *Annales*, p. 68.

Nissen ¹, par exemple, injecta des émulsions microbiennes dans les vaisseaux d'un animal; les voyant disparaître rapidement du torrent circulatoire, il admit que le sang (ce qui, dans son esprit, signifie la partie liquide du sang, c'est-à-dire le plasma) contenait réellement la substance bactéricide du sérum sanguin. On sait actuellement que, dans cette destruction microbienne, toute l'intervention revient aux leucocytes du sang en circulation et à certaines cellules de l'organisme (Wyszkowicz). D'autres fois, il expérimente *in vitro* sur du sang rendu incoagulable, soit par l'injection préalable de peptone dans les vaisseaux de l'animal (notons qu'on doit parfois injecter jusqu'à 45 c. c. chez un chien), soit en recevant du sang dans une solution de sulfate de magnésium. Tandis que le sang peptonisé est bactéricide, le sang magnésien ne l'est pas; ce dernier fait s'explique par les observations mêmes de Nissen. En effet, du sérum additionné de sulfate de magnésium perd son pouvoir bactéricide; d'autre part, Nissen affirme que le sang peptonisé détruit très rapidement les leucocytes; cette dernière méthode est donc tout à fait impropre à résoudre le problème actuel, puisque le plasma peptonisé pourra n'avoir reçu d'alexine qu'après la mort des leucocytes.

En résumé, ces procédés apportent difficilement des résultats inattaquables. Toutefois, peu après, Buchner et Voit ² reprirent les injections intravasculaires d'émulsions microbiennes et la peptonisation du sang; leurs conclusions, qui sont analogues à celles de Nissen, ne sont donc pas absolument exemptes de toute critique. Nous en dirons autant des expériences où ces auteurs, broyant du sang *coagulé* de chien, enensemencent des fragments dans les plaques de gélatine, et concluent par là au pouvoir bactéricide du sang complet.

La même année, Buchner et son élève Orthenberger ³ reprenaient la question; du sang peptonisé était laissé au repos pendant 3 jours, et le plasma ainsi obtenu était bactéricide; pendant 3 jours, ce plasma est resté en contact avec les leucocytes du sang, évidemment très avariés et par conséquent bien peu identiques à ce qu'ils sont dans les vaisseaux; on ne peut donc savoir par là si le plasma ainsi obtenu était déjà bactéricide lors

1. NISSEN, *Zeitschr. für Hygiene*, 1889, n° 6.

2. BUCHNER et VOIT, *Arch. f. Hyg.*, 1890, X.

3. BUCHNER et ORTHENBERGER, *Idem*.

de la saignée, ou s'il l'est devenu quand les globules blancs ont été altérés.

Cette idée que l'alexine existe normalement dans le plasma sanguin pendant la vie, fut aussi admise par MM. Denys et Kaisin ¹; ces savants, constatant que le pouvoir bactéricide du sang (les auteurs ne disent pas s'il s'agit de sang complet, de sang coagulé ou de sang défibriné) diminue ou disparaît à la suite d'injections intravasculaires de microbes, admirent qu'il devait exister *in vitro* dans le sang, tandis que nous savons aujourd'hui que ces fluctuations du pouvoir germicide du sérum correspondent simplement à des variations identiques du nombre des leucocytes dans le sang.

L'année suivante, MM. Denys et Havet ² arrivaient à un résultat tout opposé; ces auteurs, filtrant du sang sur papier Joseph, constatent que, chez le chien, le liquide ainsi privé de leucocytes est beaucoup moins bactéricide que le sang complet; cela revient à dire que le plasma du chien n'est pas bactéricide. Notons d'abord que, chez l'homme, MM. Denys et Havet firent une constatation inverse; et ensuite que jamais ils ne parlent de la coagulation des sangs employés, fût-ce même pendant 1 et 2 jours; il est bien évident que ce phénomène a dû se produire à quelque moment de l'expérience, et que l'on ne peut être convaincu que les liquides employés correspondent à ce qu'ils sont dans l'organisme vivant.

D'autre part, nous connaissons actuellement un certain nombre de faits qui, s'ils ne sont pas la démonstration absolue de l'absence d'alexine dans le plasma, permettent toutefois de supposer qu'il en est ainsi. C'est ainsi que M. Metchnikoff ³ chez les animaux vaccinés contre le choléra, M. Salimbeni ⁴ chez des animaux hypervaccinés contre le choléra, le streptocoque et le bacille diphtérique, ont parfaitement vu que les microbes injectés sous la peau de ces animaux ne meurent nullement, sauf à l'intérieur des leucocytes, ce qui revient à dire que l'alexine n'existe chez l'organisme qu'en eux et nullement dans le liquide des tissus. De même, M. Bordet ⁵ démontra qu'un œdème obtenu,

1. DENYS et KAISIN : *La Cellule*, 1893.

2. DENYS et HAVET : *La Cellule*, 1894.

3. METCHNIKOFF : *Ces Annales*, 1895.

4. SALIMBENI : *Idem*, 1897.

5. BORDET : *Ces Annales*, 1895.

chez des animaux vaccinés, par ralentissement de la circulation, renferme la sensibilisatrice du choléra, mais non pas l'alexine, puisqu'à lui seul il ne donne pas le phénomène de Pfeiffer. Evidemment, il ne s'agit pas là de plasma sanguin, mais de liquide transsudé hors des vaisseaux, ce qui pourrait modifier la teneur en alexine de ce liquide.

Un autre fait, plus démonstratif encore, est évidemment celui qu'observa M. Cantacuzène ¹ en 1897. Il vit que, dans la pulpe de la plume chez l'oie atteinte de spirillose, le microbe causal de l'affection reste parfaitement vivant et très mobile dans le sang non coagulé, alors qu'aussitôt la coagulation survenue, c'est-à-dire aussitôt que le plasma est devenu sérum, le spirillum disparaît rapidement. Il y a donc eu passage dans le sérum d'une substance n'existant pas dans le plasma de l'oie. A côté de ce fait, il en est d'autres bien connus, parmi lesquels je citerai la contradiction qui existe entre le pouvoir bactéricide du sérum de lapin neuf pour le *bacillus anthracis* et la réceptivité de cet animal pour le charbon, ce qui indique bien que le sérum normal ne correspond nullement au sang circulant.

En somme, toutes les tentatives faites jusqu'à présent *in vitro* pour résoudre la question qui nous occupe, ont amené les savants à admettre que le plasma sanguin contient l'alexine, que celle-ci soit ou non d'origine leucocytaire; au contraire, tous ceux qui ont observé les phénomènes dans l'organisme, ne peuvent admettre cette conclusion et se rallient à l'opinion de M. Metchnikoff.

Nous nous sommes proposé de rechercher s'il est possible d'observer *in vitro* quelque différence entre le pouvoir bactéricide du sérum sanguin et celui du plasma.

Préparation du plasma.

Plusieurs moyens se présentent évidemment à l'esprit pour obtenir *in vitro* un liquide analogue ou sensiblement identique au plasma normal. Disons tout de suite que la méthode de M. Delezenne ², qui permet aisément de se procurer du plasma d'oiseau totalement incoagulable, ne nous a jamais mené à un semblable résultat chez les mammifères, comme M. Delezenne

1. CANTACUZÈNE : *Ces Annales*, 1897.

2. DELEZENNE : *Arch. de physiolog.*, 1897.

lui-même du reste l'a constaté, et ainsi que nous l'avons dit antérieurement (Bordet et Gengou¹). Seuls, les produits incorporés au sang, tels que la peptone, le sulfate de magnésium, l'oxalate de potassium, etc., permettent d'obtenir facilement un sang incoagulable qu'on peut centrifuger rapidement, de façon à en récolter le plasma plus ou moins débarrassé de leucocytes. Nous avons vu plus haut les objections que l'on peut faire à l'emploi de la peptone et du sulfate de magnésium; l'oxalate de potassium n'est pas un meilleur moyen, ainsi qu'on peut le voir par l'expérience suivante :

	Bouillon.	Bouillon oxalaté	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Sérum oxalaté non chauffé.	Sérum oxalaté chauffé à 55°.	Plasma oxalaté non chauffé.	Plasma oxalaté chauffé.
I.	16,800	19,400	9,600	12,000	8,360	13,200	12,800	17,200
II.	3,960	19,600	0	4,000	2,860	15,444	7,400	9,900
III.	∞	∞	0	31,200	3,250	∞	32,000	∞
IV.	∞	∞	0	∞	∞	∞	∞	∞

Il s'agit de sérum de lapin; la quantité d'oxalate de potassium ajoutée était telle que la proportion de ce sel dans le sang était de 1 p. 1,000. Le microbe expérimenté était le vibrion cholérique.

Cette expérience démontre que l'oxalate de potassium, à la dose employée, n'est pas bactéricide pour le choléra (bouillon oxalaté), il détruit en grande partie, comme le sulfate de magnésie, l'alexine du sérum normal (sérum normal oxalaté), de telle sorte qu'on ne peut attribuer aucune signification aux résultats fournis par le plasma oxalaté.

Aussi avons-nous eu recours à une autre méthode, qui consiste d'abord à recevoir le sang dans de petits tubes entourés de glace fondante, et mis aussitôt à la turbine pour en décanter le plus tôt possible le plasma centrifugé. Cette technique, qui nous a donné quelques résultats, a toutefois certains désavantages; la centrifugation du sang nécessitant souvent 1 h. 1/2 à 1 h. 3/4 avant de donner un plasma suffisamment dépourvu de leucocytes, il faut souvent l'interrompre (toutes les 20 ou 30 minutes)

1. BORDET et GENGOU, *Ces Annales*, mars 1901.

pour renouveler la glace, de façon à maintenir une température basse, sans quoi le plasma se coagule rapidement, avant qu'on ne l'ait décanté. En outre, cette méthode, quoique non identique à la façon dont Buchner extrayait l'alexine des collections leucocytaires (congélation), s'en rapproche toutefois assez, pour qu'on ait tout lieu de craindre que les globules blancs ne supportent pas toujours sans altération une température de 0° pendant près de 2 heures.

Néanmoins, elle fut par nous employée au début quelques fois; on obtient de la sorte un plasma limpide, pour ainsi dire privé de cellules, qui se coagule très rapidement, dès que sa température s'est un peu relevée.

Dans la suite nous nous sommes servis d'un autre mode de fabrication du plasma, basé sur les anciennes recherches de Freund, et qui consiste à recevoir le sang dans des tubes enduits intérieurement de paraffine. Comme nous avons décrit antérieurement cette méthode en détail¹, nous n'en dirons ici que ce qui intéresse directement le présent travail. Nous avons de la sorte obtenu du plasma qui, chez le lapin et chez le chien, se coagule le plus souvent, en tube paraffiné, 4 à 5 heures après la saignée, mais incomplètement, car le liquide exsudé du caillot ainsi formé, reporté dans des tubes non paraffinés, se coagule encore successivement 2 ou 3 fois. Chez le rat, on doit, pour obtenir du plasma, entourer les tubes paraffinés de glace fondante; on recueille ainsi un liquide qui se coagule instantanément et complètement, en tubes paraffinés, dès qu'on le retire de la glace.

En somme, le plasma ainsi récolté contient une certaine quantité de fibrin-ferment, quantité évidemment inférieure à la totalité de cette substance, mais toutefois très notable, plus encore chez le rat que chez le lapin et le chien. Or ce fibrin-ferment est d'origine leucocytaire, comme l'alexine, et s'il est vrai que celle-ci ne sort du globule blanc qu'après la mort ou l'altération de ce dernier, on ne peut se défendre de craindre que le leucocyte, pendant les manipulations, n'en laisse aussi exsuder une partie; on peut donc s'attendre à ce que notre plasma de chien, de lapin et surtout de rat, renferme une certaine quantité d'alexine leucocytaire.

1. BORDET et GENGOU, *loc. cit.*

Comme nous l'avons dit plus haut, ces plasmas se coagulent toujours, de telle sorte que le liquide qui s'en écoule lors de la rétraction du caillot, en diffère par l'absence de fibrinogène passé à l'état de fibrine concrète. La méthode permet donc d'obtenir un sérum, mais un sérum formé seulement quand la centrifugation a chassé presque tous les leucocytes ; il s'est donc formé en l'absence de ceux-ci, et si l'alexine ne s'échappe du globule blanc qu'après son altération, le sérum ainsi obtenu n'en contiendra que ce que les manipulations rendent inévitable.

Pour pouvoir comparer avec plus de raison les plasmas que nous avons obtenus avec les sérums des mêmes animaux, le sang destiné à fournir ces derniers fut soumis aux mêmes conditions de température et de milieu (paraffine) que celui dont nous tirions les plasmas. Voyons actuellement si les deux méthodes que nous avons employées, et en particulier la dernière qui nous a servi davantage, n'ont pas l'inconvénient d'altérer ou de détruire la puissance bactéricide des liquides en expérience. Dans ce but, nous avons comparé le pouvoir microbicide du sérum de lapin recueilli dans les conditions habituelles, à celui du sérum du même animal recueilli et formé dans des tubes paraffinés, avec ou sans l'aide d'une basse température.

	CHARBON			CHOLÉRA		
	Sérum normal.	Sér. formé dans la paraffine.	Sér. formé dans la par. et refr.	Sérum normal.	Sér. formé dans la paraffine	Sér. formé dans la par. et refr.
I.	816	792	800	2,204	1,980	2,422
II.	0	0	0	0	0	0
III.	0	0	0	0	0	0

Il en résulte que les manipulations auxquelles a été soumis le sang dans cette expérience, n'ont pas altéré sa puissance microbicide, et qu'elles peuvent être appliquées à la recherche de l'alexine dans le plasma obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut.

De son côté, M. Danysz, ainsi que nous l'avons appris par une communication orale, s'occupe également en ce moment de l'étude comparative du pouvoir hémolytique du sérum et du

plasma de plusieurs espèces animales; ses recherches feront l'objet d'une publication ultérieure.

A. — EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN.

I. — Sur la bactériidie charbonneuse.

Plasmas obtenus par la méthode de la glace fondante.

LAPIN 1.					
	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°	Plasma ¹ non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	3,220	4,008	2,903	3,710	4,087
II.	3,800	3,422	2,824	3,788	3,908
III.	∞	0	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

1. Nous désignerons sous le nom de plasma le liquide que donne en se rétractant le plasma obtenu par centrifugation.

LAPIN 2.										
	SÉRUM NON CHAUFFÉ					PLASMA NON CHAUFFÉ				
	1 anse.	2 anses	4 anses.	6 anses.	1 gtte.	1 anse.	2 anses.	4 anses.	6 anses.	1 gtte.
I.	242	621	1,012	2,207	4,500	228	402	809	1,408	2,700
II.	0	0	0	0	0	1,140	1,520	2,280	4,730	∞
III.	0	0	0	0	0	∞	∞	∞	∞	∞

Plasmas obtenus par la méthode de tubes paraffinés.

LAPIN 3.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	284	308	352	381
II.	21	324		428
III.	0	∞	250,000 environ	∞
IV.	0	∞	∞	∞
LAPIN 4.				
I.	36	44	42	39
II.	10	52	8	21
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 5.				
I.	620	686	584	708
II.	1	598	693	620
III.	0	∞	37,125	∞
LAPIN 6.				
I.	693	670	690	720
II.	10	692	3,564	744
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 7.				
I.	6,250	4,812	5,128	5,308
II.	0	5,240	2,552	5,722
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 8.				
I.	2,720	2,928	2,608	2,510
II.	0	3,087	232	2,409
III.	0	∞	10,430	∞

LAPIN 9.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	1,110	889	932	1,008
II.	20	912	408	1,220
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 10.				
I.	822	948	849	1,020
II.	0	1,112	212	1,308
III.	0	∞	∞	∞

II. — *Sur le vibrion cholérique.*

Plasma obtenu par la méthode de la glace fondante.

LAPIN 1.					
	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	2,280	1,012	608	980	1,012
II.	976	0	490	0	488
III.	∞	0	∞	2,423	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

Plasmas obtenus par la méthode des tubes paraffinés.

LAPIN 3.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	12,800	13,100	10,640	9,728
II.	0	15,800	15	9,904
III.	0	∞	24,750	∞
IV.	0	∞	∞	∞

LAPIN 4.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	288	342	321	207
II.	0	381	19	292
III.	0	∞	∞	∞

LAPIN 5.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	5,940	6,020	3,748	7,408
II.	2	18,000	280	9,200
III.	0	∞	∞	∞

III. — *Sur le bactérium coli.*

Plasmas obtenus par la méthode des tubes paraffinés :

LAPIN 4.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	3,020	2,904	2,880	3,402
II.	0	13,208	108	6,020
III.	0	∞	∞	∞

LAPIN 7.								
	SÉRUM NON CHAUFFÉ			Sérum ch. à 55°	PLASMA NON CHAUFFÉ			Plasma chauffé à 55°.
	1 goutte.	2 gouttes.	4 gouttes.		1 goutte.	2 gouttes.	4 gouttes.	
I.	36,288	52,420	102,760	25,222	37,408	50,800	103,620	24,920
II.	14,616	68,914	1,726,000	980,000	441,700	678,600	1,469,800	1,213,000
III.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

IV. — Sur le bacillus typhosus.

LAPIN 5.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°
I.	9,010	8,720	7,910	6,622
II.	0	9,428	230	8,030
III.	0	∞	14,400	∞

Comme on peut s'en rendre compte d'après les tableaux précédents, nous avons beaucoup plus fréquemment trouvé une différence dans le pouvoir bactéricide du sérum et du plasma vis-à-vis de la bactériémie charbonneuse qu'envers les 3 autres espèces microbiennes dont nous nous sommes servi. Presque toujours, le bacillus typhosus et le bacterium coli résistèrent trop à l'alexine, même du sérum, pour qu'une différence entre es divers milieux soit perceptible; au contraire, dans maintes expériences, le choléra suc'omba aussi rapidement dans le plasma que dans le sérum, alors que ces liquides, provenant des mêmes animaux, se comportaient très différemment pour la bactériémie charbonneuse (lapin 6, 8, 9, 10).

Craignant une fausse interprétation des faits, nous nous sommes proposé de rechercher si cette différence d'action vis-à-vis de ces deux espèces bactériennes était due simplement à ce que la bactériémie charbonneuse, assez peu sensible à l'alexine

du lapin, se prête suffisamment à une différenciation entre le sérum et le plasma, imperceptible avec le vibron cholérique trop sensible à cette alexine, ou bien si nous avons affaire à deux substances différentes, l'une agissant sur le charbon et rare dans le plasma, l'autre, l'alexine, agissant sur le vibron cholérique et présente dans le plasma en circulation.

Nous basant sur la démonstration qu'a faite M. Bordet¹ de l'unité de l'alexine contenue dans le sérum normal de chaque espèce animale, nous avons fait absorber, par des globules de poule sensibilisés, l'alexine d'une certaine quantité de sérum de lapin frais. Ce sérum, privé d'alexine, fut ensuite réparti en 2 tubes, dont l'un reçut une goutte de vibrions cholériques sensibilisés, et l'autre une goutte d'une émulsion charbonneuse. Comme il était aisé de le prévoir, le vibron, plongé dans ce sérum sans alexine, ne présenta pas le phénomène de Pfeiffer; or la bactériodie charbonneuse se montra, elle aussi, absolument intacte dans ce milieu sans alexine et s'y multiplia. Naturellement, des tubes identiques avaient subi des préparations analogues, avec cette différence que les globules de poule n'avaient pas été sensibilisés et n'avaient, par conséquent, pas fixé l'alexine; dans ces tubes, le choléra subit la transformation granuleuse et la bactériodie charbonneuse y succomba, comme elle l'eût fait dans du sérum non préparé. L'alexine est donc bien la substance qui tue le charbon dans le sérum neuf de lapin, et c'est parce que ce microbe se prête mieux à l'expérience, que nous avons toujours observé avec cette espèce une différence entre le plasma et le sérum.

S'il en est ainsi, on peut conclure que, dans le sang circulant, le plasma du lapin ne contient pas d'alexine, car le pouvoir bactéricide du liquide employé comme plasma dans nos expériences, pouvoir bien inférieur à celui du sérum, doit être imputé à la petite quantité d'alexine qui s'échappe, pendant les manipulations, des leucocytes souffrants. N'oublions pas, en effet, que notre plasma est loin d'être du plasma vrai, et qu'il n'est qu'un liquide s'écartant, moins que le sérum, du plasma normal.

B. EXPÉRIENCES CHEZ LE CHIEN

Le sang de chien, d'une alexine moins puissante que celui

1. BORDET, *Ces Annales*, 1900. Voir aussi le n° de mars 1901.

du lapin, convient mieux que ce dernier à l'étude de l'action du sérum et du plasma sur le vibrion cholérique.

CHIEN 1. — Plasma obtenu par la méthode de la glace fondante

	Bouillon.	Sérum normal.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	1,609	1,521	2,008	1,772	1,282
II.	1,627	1,282	1,927	1,509	1,325
III.	∞	319	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

CHIEN 2. — Plasma obtenu par la méthode des tubes paraffinés.

	CHOLÉRA						VIBRIO METCHNIKOWI					
	Sérum 1 g.	Pl. 1 g.	Sérum 2 g.	Pl. 2 g.	S. 55° 1 g.	Pl. 55° 1 g.	Sérum 1 g.	Pl. 1 g.	Sérum 2 g.	Pl. 2 g.	S. ch. 1 g.	Pl. ch. 1 g.
I.	42,720	35,860	69,420	77,760	30,560	32,420	25,920	31,100	46,656	44,850	22,800	20,896
II.	5	12	4	19	32,000	34,810	3	21	1	17	15,810	14,320
III.	22	78,900	28	155,640	∞	∞	864	102,800	16,176	148,200	∞	∞

Chez le chien comme chez le lapin, l'alexine n'existe donc pas en liberté dans le plasma sanguin.

C. EXPÉRIENCES CHEZ LE RAT.

Il nous a paru intéressant de rechercher si le plasma de rat présente, vis-à-vis de la bactérie charbonneuse, le pouvoir bactéricide si intense que possède le sérum de cette espèce animale. Nous nous sommes adressé dans ce but au rat gris, plutôt qu'au rat blanc, parce que ce dernier donne souvent trop peu de sang pour obtenir, chez le même animal, du sérum et du plasma, et en second lieu parce qu'il nous a paru que chez lui la

préparation du plasma est encore plus difficile que chez le rat gris. N'oublions pas qu'ici nous ne sommes parvenu, par la méthode des tubes paraffinés entourés de glace fondante, qu'à obtenir un plasma excessivement coagulable, partant, très riche en fibrin-ferment et naturellement en principes d'origine leucocytaire. Dans les expériences suivantes, le sérum et le plasma correspondants proviennent toujours du même animal, par exemple le plasma et le sérum froids, etc.

EXPÉRIENCE 1.						
	Sérum non chauffé.	Plasma non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma chauffé à 55°.	Sérum chauffé à 64°.	Plasma chauffé à 64°.
I.	348	353	374	380	447	432
II.	2	13	0	31,100	∞?	864
III.	0	∞	0	∞	∞	∞

EXPÉRIENCE 2.						
	Sérum non chauffé.	Plasma non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma chauffé à 55°.	Sérum chauffé à 64°.	Plasma chauffé à 64°.
I.	3,190	2,340	4,290	5,410	4,100	2,024
II.	0	86	926	4,312	2,250	4,896
III.	0	∞	46,656	360,000	∞	∞

EXPÉRIENCE 3.						
	Sérum non chauffé.	Plasma non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma chauffé à 55°.	Sérum chauffé à 64°.	Plasma chauffé à 64°.
I.	5,825	3,450	10,368	12,120	6,020	5,838
II.	0	288	52	720	2,321	2,592
III.	0	7,020	6,400	10,800	∞	∞

EXPÉRIENCE 4.						
	Sérum non chauffé.	Plasma non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma chauffé à 55°.	Sérum chauffé à 64°.	Plasma chauffé à 64°.
I.	4,181	1,008	625	648	576	720
II.	0	32	2	84	608	762
III.	0	20,736	0	57,014	∞	∞

En conséquence, malgré la différence considérable que l'on est en droit de supposer entre le plasma vrai et ce que la mé-

thode des tubes paraffinés nous livre comme représentant du plasma, il est très facile de constater que ce dernier est bien moins bactéricide pour la bactéridie charbonneuse que le sérum du même animal. Etant donné la richesse de ce liquide en produits leucocytaires, on peut admettre que le faible pouvoir microbicide qu'il témoigne ne lui appartient pas en propre, mais lui vient des leucocytes avariés pendant les manipulations.

Si l'on compare les liquides chauffés à 55° aux liquides qui n'ont pas subi d'élévation de température, on peut se demander si la différence de prolifération microbienne que l'on y observe, tient à ce que le chauffage à 55° a détruit l'alexine, laissant persister dans les liquides la substance qui tue le charbon, rare dans le plasma, abondante dans le sérum et qui n'est détruite que vers 64°, ou bien s'il s'agit d'un affaiblissement, d'une dégradation d'une seule et même substance, détruite complètement seulement vers 64°. C'est dans ce but que nous avons fait avec le sérum de rat, une expérience identique à celle que nous avons rapportée plus haut, et qui nous a désigné l'alexine du lapin comme l'agent bactéricide du sérum vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse. Nous avons simplement remplacé ici le sérum de lapin par le sérum de rat. Quoique moins nets que chez le lapin, les résultats permettent cependant d'admettre qu'il s'agit d'une seule et même substance.

En effet, là où l'alexine fut laissée intacte par les globules de poule non sensibilisés, la bactéridie charbonneuse succomba complètement en 2 heures, de même qu'après ce laps de temps on n'apercevait plus, dans le tube similaire, que quelques rares vibriions cholériques transformés en granules. Au contraire, là où les globules sensibilisés de poule avaient absorbé l'alexine, à côté d'un certain nombre de microbes charbonneux altérés, on en voyait une grande quantité d'intacts; or, le tube similaire montrait lui aussi, à côté de vibriions cholériques intacts, un assez bon nombre de granules de Pfeiffer. Par conséquent, l'alexine n'avait pas été absorbée complètement par les globules de poule, ce qui explique qu'un certain nombre de bactéridies charbonneuses avaient été touchées par l'alexine restante.

Malgré l'imperfection de cette méthode, que nous avons

choisie parce qu'elle nous a semblé être celle qui, tout en retardant suffisamment la coagulation du sang, en altère le moins les éléments, nous sommes donc arrivé à constater que le sérum, formé aux dépens du plasma privé autant que possible de leucocytes, est infiniment moins riche en alexine, chez le chien et chez le lapin, que le sérum des mêmes animaux, obtenu par coagulation habituelle, c'est-à-dire en présence des globules blancs du sang. Cela nous permet de conclure non seulement que les leucocytes sont bien les producteurs de l'alexine des sérums normaux, mais encore qu'ils la gardent en eux tant que leurs conditions normales de vie dans le liquide sanguin ne sont pas modifiées. Cette donnée cadre du reste parfaitement avec les résultats observés antérieurement par MM. Metchnikoff, Bordet, Salimbeni et Cantacuzène.

De même, chez le rat, la substance si bactéricide du sérum vis-à-vis du bacillus anthracis, et que nous pensons être une alexine, n'existe pas dans le plasma en circulation.

VARIABILITÉ DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE

DU BACILLE D'ÉBERTH

PAR M. E. SACQUÉPÉE

Médecin aide-major de 1^{re} classe,
Chef du laboratoire militaire de bactériologie de Rennes.

Dès le début des recherches sur l'agglutination du bacille typhique par les sérums homologues, on érigea en dogme que l'aptitude agglutinative (ou le degré de sensibilité vis-à-vis des agglutinines) du bacille d'Eberth est toujours sensiblement égale vis-à-vis d'un même sérum. En effet, toute une série d'échantillons, provenant de laboratoires très divers, se montrèrent agglutinables aux mêmes doses limites; les variations individuelles furent très restreintes, et de ceci on pouvait conclure que le taux d'agglutination maxima reste le même, quel que soit l'échantillon d'Eberth mis en expérience.

Ces conclusions furent à peu près partout admises et vérifiées. Cependant, plus tard, on put constater de rares exceptions; les uns déclarant qu'il existe, chez le b. typhique, des bacilles primitivement insensibles au sérum spécifique, mais susceptibles d'« acquérir » à la longue la même aptitude agglutinative que l'Eberth type; d'autres rencontrant des bacilles présentant l'ensemble des attributs de l'Eberth, mais notablement plus agglutinables que ce dernier.

La question posée dans ce travail est la suivante :

L'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth est-elle susceptible de subir des variations notables, et, s'il en est ainsi, dans quelles conditions se produisent ces variations.

Deux mots d'abord sur la technique employée. Quand il s'agit de pratiquer un sérodiagnostic, on s'adresse à une culture jeune de 24 heures, en bouillon. Or tout le monde sait que la richesse de cette culture est très variable, pour un même échantillon, suivant les milieux, et surtout pour un même milieu suivant les échantillons de bacilles; richesse que traduit le

trouble plus ou moins prononcé du milieu. Ces variations individuelles peuvent n'avoir pas grande importance dans la pratique courante du séro-diagnostic, parce qu'il importe assez peu que l'on soumette à l'épreuve quelques bacilles de plus ou de moins, vu l'extrême variabilité du pouvoir agglutinant du sérum; encore est-il que, même dans ce cas, une plus grande précision ne serait aucunement nuisible. Mais lorsqu'on veut éprouver l'aptitude agglutinative de bacilles différents, il faut de toute nécessité mettre en présence d'une même dose de sérum une même quantité de bacilles sous un même volume, autrement dit comparer entre elles des cultures *de même densité*.

L'expérience suivante le démontre. Une culture très riche d'Eberth en bouillon (tube A) est additionnée de 5 fois (tube B) et de 10 fois (tube C) son volume de bouillon neuf; après agitation, on prélève des volumes égaux de chaque tube, auxquels on ajoute une égale quantité d'un même sérum; voici le résultat, au bout d'une heure.

Culture.	Sérum 1 p. 150	Sérum 1 p. 300	Sérum 1 p. 500	Sérum 1 p. 1000	Sérum 1 p. 2000
Tube A.	Agglutination presque complète.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.
Tube B.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination presque complète.	Agglutination légère.	Aggl. nulle.
Tube C.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination légère.	Aggl. nulle.

C'est-à-dire que le nombre des bacilles agglutinés est toujours sensiblement le même, quel que soit le volume du liquide : ce nombre est moins élevé cependant lorsque la culture est fortement diluée.

Or très souvent les bacilles isolés des eaux ou de l'organisme se développent moins bien que l'Eberth type : nous entendons par là l'Eberth habitué depuis plusieurs années aux cultures successives sur milieux artificiels. Si l'on ne tient pas

compte de l'expérience précédente, leur aptitude agglutinative sera jugée supérieure à ce qu'elle est en réalité.

Il est donc nécessaire d'obtenir des cultures de même densité. On y arrive en émulsionnant dans l'eau des cultures récentes sur gélose ordinaire, jusqu'à ce que le liquide présente un trouble comparable à un type conventionnel obtenu par l'action du nitrate d'argent sur une solution de NaCl à 0,1 gr. par litre; laisser reposer quelques heures afin de faire déposer les quelques amas persistants.

Le deuxième facteur en expérience, le sérum typhique, est facilement prélevé soit chez l'homme atteint de fièvre typhoïde soit chez le lapin immunisé; ces deux groupes de sérums, d'origine différente, ont toujours été employés concurremment; les résultats relatifs se sont trouvés identiques ou à peu près.

Toutes les mensurations sont faites sous le microscope, comparativement avec l'Eberth type. Afin de mettre mieux en évidence les résultats obtenus, nous désignerons sous le nom de *Rapport d'aptitude agglutinative* (R A) le rapport de la limite maxima d'agglutination d'un bacille en expérience, à la limite maxima d'agglutination de l'Eberth type. Par exemple, une goutte d'un même sérum agglutine l'Eberth type à 1/150 et un Bac. C à 1/10; dans ce cas $RA = 10/150 = 0.066$.

A priori, et pour parcourir toute la gamme des variations possibles, on peut se demander s'il existe des bacilles typhiques moins agglutinables ou plus agglutinables que l'Eberth type; et la réponse étant affirmative, il y aura lieu de chercher à reproduire artificiellement ces mêmes variations en partant de l'Eberth type.

Nous étudierons donc successivement :

- 1° Les bacilles typhiques non agglutinables d'emblée;
- 2° La transformation de l'Eberth type en Eberth non agglutinable;
- 3° Les bacilles typhiques hyperagglutinables d'emblée;
- 4° La transformation de l'Eberth type en Eberth hyperagglutinable.

I. — BACILLES TYPHIQUES NON AGGLUTINABLES D'EMBLÉE.

On rencontre parfois dans les eaux, typhoïgènes ou non, des microbes qui présentent l'ensemble presque complet des attri-

buts de l'Eberth (caractères classiques de morphologie et de coloration des cultures sur milieux ordinaires, développement sur milieux phéniqués à haute température; non fermentation des milieux lactosés; absence d'indol dans les cultures, non accroissement sur milieux vaccinés par l'Eberth, pouvoir pathogène variable chez l'animal) et ne différant de l'Eberth type que par deux caractères : ils sont très peu agglutinés par le sérum des typhiques; leur culture sur pomme de terre est comparable à une glaçure colorée en brun clair ou en brun chocolat. Ce dernier caractère est d'ailleurs à peu près général chez les bacilles typhiques authentiques récemment extraits de l'organisme.

On peut désigner de tels microbes sous le nom de *bacilles éberthiformes*. En voici trois exemples :

1° Bacille rencontré dans les eaux de Castres, notoirement typhoïgènes à l'époque (Bac. C). Ce bacille présente tous les caractères précédemment énumérés; $RA = 0,066$;

2° Bac. extrait des eaux de Nogent-sur-Marne, eaux qui n'ont jamais été accusées de provoquer la fièvre typhoïde (Bac. N); mêmes caractères, $RA = 0,1$;

3° Eaux de X. sûrement typhoïgènes (Bac. P); mêmes caractères, $RA = 0,15$.

Dans l'organisme du typhique, on peut également trouver des microbes identiques à tous les points de vue. Sur 3 rates typhoïdiques prélevées 24 heures *post mortem*, les cultures ont donné uniquement des bacilles dont les caractères sont copiés sur ceux des Bac. C, N et P; un quatrième échantillon, de provenance analogue et de mêmes propriétés, nous a été obligeamment remis par notre excellent camarade Lafforgue.

Dans un cinquième cas, une quantité notable de pulpe splénique put être prélevée 4 heures après la mort; les cultures faites immédiatement donnèrent naissance à l'Eberth classique très agglutinable (Bac. S). Cette pulpe fut conservée telle quelle, à l'abri de toute contamination; après 8 jours, même bacille S très agglutinable; au bout de 15 jours, bacille éberthiforme non agglutinable (Bac. T); $RA = 0,15$.

En troisième lieu enfin, à côté du coli et de bacilles d'Eberth authentiques, le milieu de Piorkowsky permet d'isoler, dans les selles de typhoïdiques, des microbes identiques aux Bac. C, T,

etc., et en nombre d'autant plus grand, semble-t-il, que la maladie est plus avancée dans son évolution.

Dans le tableau ci-dessous, nous résumons l'origine et les caractères anormaux des éberthiformes étudiés dans la suite.

DÉNOMINATION	PROVENANCE	R. A.	CULTURE S. POMME DE TERRE
Bac. C.	Eaux typhoïgènes.	0.066	Culture colorée peu épaisse.
Bac. P.	—	0.15	—
Bac. N.	Eaux non typhoïgènes.	0.10	—
Bac. A.	Rate typhique.	0.15	—
Bac. B.	—	0.10	—
Bac. F.	—	0.05	—
Bac. L.	—	0.25	—
Bac. T.	—	0.15	—
Bac. E.	Selles de typhoïdiques.	0.10	—
Bac. K.	—	0.20	—

Avant de pousser plus loin cette étude, il importe de faire remarquer que la notion classique : tous les bacilles typhiques sont agglutinés de la même manière par un même sérum typhique, comporte un corollaire obligé : tout bacille peu ou pas agglutinable par le sérum typhique, ne saurait être un bacille d'Eberth. La déduction, non formulée au début, l'a été depuis. C'est-à-dire qu'un milieu naturel, souillé par les éberthiformes ici étudiés, à l'exclusion de l'Eberth authentique, ne doit pas être considéré, d'après la doctrine, comme spécifiquement infecté. La question, posée sous ce jour, présente un sérieux intérêt, pour l'hygiène surtout.

Quelle est donc la signification de ces bacilles éberthiformes? leur parenté avec l'Eberth est évidente; reste à savoir si le fossé qui les sépare de ce dernier, le défaut d'aptitude agglutinative, peut être comblé. C'est ce qu'il faut tenter maintenant.

Les premiers éberthiformes ayant été extraits des eaux, on pouvait se demander s'ils ne représentaient pas des bacilles typhiques atténués par un long séjour dans les milieux extérieurs. On fit des passages successifs par l'organisme animal,

sans autre résultat que de fixer davantage les caractères hybrides du début.

La solution devait être donnée par le hasard. Ces bacilles des eaux (C et N) ayant été conservés en tube clos à l'abri de l'air et de la lumière furent repris après six mois. Ils étaient parfaitement vivants; mais leur culture, cette fois, ne différait en rien de celle de l'Eberth type : glaçure incolore sur pomme de terre; surtout, les bacilles C et N étaient exactement aussi agglutinables que l'Eberth type : $RA = 4$ avec tous les sérums. Le résultat fut exactement le même avec tous les autres éberthiformes, quelle que fût leur origine : eaux, rate, intestin; conservés en tubes clos, tous devinrent agglutinables au même titre que l'Eberth type après 6, 8 ou 10 mois¹.

D'ailleurs, cette acquisition (ou plutôt, comme nous le verrons, cette récupération) de l'aptitude agglutinative se fait progressivement. Un seul exemple le démontrera, tous les éberthiformes s'étant comportés de façon identique.

Bac. E, extrait de selles typhiques, le 13 mars : à cette époque $RA = 0,40$; conservation en tube clos; le 10 juin $RA = 0,35$; le 18 août $RA = 0,50$; au 8 octobre, $RA = 1$. Ultérieurement, l'aptitude agglutinative reste immuable.

Les passages successifs, espacés ou rapprochés sur bouillon ordinaire¹ donnent lieu à la même transformation, en un temps généralement un peu plus long. Les cultures successives sur pomme de terre, milieux lactosés, milieux phéniqués, etc., n'ont aucunement hâté le retour de l'aptitude agglutinative. Le procédé le plus simple est donc en même temps le plus efficace.

Jusqu'ici nous avons laissé dans l'ombre l'action de nos éberthiformes sur l'animal. Ces bacilles sont généralement très pathogènes pour le cobaye, beaucoup plus qu l'Eb. type. Ce fait n'a rien de surprenant; car la plupart de ces microbes provenaient directement de l'organisme et n'étaient pas affaiblis par une longue conservation.

Plus intéressantes sont les propriétés des sérums des animaux inoculés. La réponse s'est toujours montrée la même : le sérum d'animaux inoculés avec les bac. P, B, F, T, K, se montre beaucoup plus actif vis-à-vis de l'Eb. type que vis-à-vis

1. Une transformation du même genre a été également notée par M. Rodét, *Journal de Physiologie et de Pathologie générales*, 1900.

du bac. inoculé ; autrement dit, les propriétés de ces différents sérums sont exactement celles du sérum typhique, et les rapports RA restent les mêmes qu'avec le sérum spécifique.

Citons un exemple : un lapin dont le sérum est inactif à 4 p. 10 vis-à-vis de tous les bac. en expérience, est inoculé avec 4 c. c. de culture stérilisée de bacilles T ; on prélève du sérum 6 jours après l'inoculation ; à ce moment, le sérum agglutine l'Eb. type à 1 p. 550 et n'agglutine qu'à dose bien moindre, soit le bac. T. soit les autres éberthiformes ; et, pour T., on trouve $RA = 0,15$, exactement comme vis-à-vis du sérum typhique.

Il y a plus : les éberthiformes sont doués d'un pouvoir agglutinogène plus élevé que l'Eb. type. Deux séries de lapins de même âge et de même poids sont inoculés, les premiers avec 4 c. c. de culture stérilisée des bac P, F, B, T ; les autres avec 4 c. c. de culture stérilisée d'Eb. type. Les animaux de la première série fournissent un sérum beaucoup plus agglutinant que ceux de la seconde.

Deux lapins aussi identiques que possible comme âge et comme poids, et dont le sérum n'agglutine aucun bacille à 4 p. 10, sont inoculés avec mêmes quantités de cultures également denses de l'Eb. type (lapin A) et de bac. T (lapin B) ; après 8 jours, le sérum B agglutine l'Eb. type à 4 p. 550 ; le sérum A à 4 p. 250 seulement.

De telle sorte qu'à considérer seulement les deux termes extrêmes de la série : Eb. type très agglutinable et bac. éberthiforme, on pourrait émettre ce paradoxe que ces microbes sont d'autant plus agglutinables que leur pouvoir agglutinogène est moindre. Une opinion semblable a déjà été émise, quand on est venu avancer que l'Eberth est d'autant moins agglutinable qu'il est plus virulent. D'ailleurs ces deux formules sont toutes deux inexactes, car nous verrons plus tard qu'il existe des bacilles à la fois hyperagglutinables et hyperagglutinogènes ; et, dans les exemples ci-dessus rapportés, l'exagération du pouvoir agglutinogène est due à ce que les éberthiformes récemment extraits de l'organisme animal sont au maximum de leur virulence.

En résumé, on peut rencontrer dans les eaux ou chez les typhiques des bacilles présentant l'ensemble complet des caractères connus des bacilles d'Eberth, sauf deux : absence ou énorme réduction de l'aptitude agglutinative, et coloration de la culture sur pomme de terre. Le sérum des animaux inoculés à

l'aide de ces microbes présente les propriétés du sérum typhique ; et ces mêmes microbes conservés pendant quelques mois reprennent tous les caractères de l'Eberth, y compris l'aptitude agglutinative et l'aspect des cultures sur pommes de terre.

II — REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE BACILLES ÉBERTHIFORMES.

Il a déjà été dit que les éberthiformes se rencontrent couramment chez les typhoïdiques, à une période avancée de la maladie. Au groupe précédent s'ajoutent les éberthiformes rencontrés dans les eaux ; l'identité parfaite de leurs caractères originels, de leurs transformations ultérieures et de leurs réactions pathogènes, invite à penser que ce deuxième groupe reconnaît la même provenance que le premier : ils sont en relation avec une souillure accidentelle des eaux par des produits émanés de typhiques.

Cette constatation ne laisse le choix qu'à deux hypothèses. Les éberthiformes représentent, ou bien un stade d'évolution d'un microbe de type différent, le coli, vers le type Eberth ; ou bien une forme modifiée du bacille typhique. Dans l'une ou l'autre alternative, la transformation s'opère dans l'organisme typhoïdique.

Soumise au contrôle expérimental, la première conception ne semble pas répondre à la réalité des faits. Trois échantillons de coli intestinal, maintenus pendant des mois (en sacs de collodion) au contact d'organismes fortement immunisés contre le bacille d'Eb., ont conservé intégralement tous leurs caractères ; il ne s'est manifesté aucune modification susceptible de faire admettre quelque acheminement vers le type Eb. Bien entendu, nous n'affirmons nullement que la chose soit impossible ; elle ne se produit pas dans les conditions indiquées.

Reste à vérifier la seconde hypothèse ; les éberthiformes représentent une forme modifiée de l'Eberth. On immunise fortement des rats blancs contre le bac. typhique par injections de cultures stérilisées, répétées au cours de plusieurs mois : dans le péritoine d'animaux ainsi préparés, on laisse végéter l'Eb. type pendant longtemps, inclus dans des sacs de collodion. Dans ces conditions, l'Eb. perd peu à peu son aptitude agglutinative, et finalement se comporte comme les éberthiformes ; en même

temps la culture sur pomme de terre devient plus colorée, mais à peine plus abondante. L'expérience répétée trois fois (elle est longue et pénible) a toujours donné le même résultat.

Un seul exemple suffit à la démonstration. Les sacs sont toujours placés dans le péritoine de rats solidement immunisés.

Eb. type : RA = 1 (par définition) mis en sac pendant 3 semaines ; après ce temps RA = 0,85.

2^e Sac avec le bacille du sac précédent ; après un mois RA = 0,66.

3^e Sac avec le bacille du deuxième ; après un mois RA = 0,35.

4^e Sac avec le bacille du troisième ; après un mois RA = 0,20.

5^e Sac avec le bacille du quatrième ; après un mois RA = 0,15.

Ainsi donc, l'Eberth type maintenu au contact de l'organisme immunisé, perd peu à peu son attitude agglutinative. Mais il importe de faire remarquer que la transformation s'opère lentement ; il a fallu cinq mois pour atteindre le but. Soulignons en même temps que les conditions de l'expérience, bien qu'assez rapprochées de ce qui doit se passer chez le typhique, restent néanmoins très artificielles. Pour perméable qu'elle soit, la membrane de collodion ne saurait être assimilée à un tissu vivant ; en outre le péritoine ne représente nullement chez l'animal le foyer infectieux qu'est manifestement la rate chez l'homme. Il y aura lieu plus loin de le rappeler.

Reproduite *in vitro*, l'expérience précédente donne moins de résultats. Maintenu pendant longtemps (45 jours) au contact d'une grande quantité de sérum typhique (5 gouttes de culture pour 15 de sérum), l'Eb. conserve le même degré d'aptitude agglutinative. Par contre, cette dernière peut être légèrement abaissée si à une même culture d'Eberth on ajoute plusieurs fois de suite une quantité suffisante de sérum agglutinant.

On fait une culture de l'Eb. type en bouillon ; après 24 heures on ajoute le dixième de son volume d'un sérum stérile actif à 1 p. 250 : même opération deux fois de suite de deux en deux jours ; puis repiquage en bouillon ; cette deuxième culture est traitée comme la première ; enfin troisième culture en bouillon additionnée quatre fois, en dix jours, de sérum typhique : au total dix additions successives de sérum. Après ce temps, une culture issue du 3^e tube donne RA = 0,75.

Le résultat est beaucoup moins net qu'après le séjour du même Eberth au contact de l'organisme. Sans doute faut-il incriminer les échanges continuels qui se passent dans le péri-

toine, et peut-être aussi l'influence plus active des toxines à l'état naissant.

Le séjour prolongé de l'Eberth dans les cultures additionnées de substances chimiques douées de pouvoir agglutinant (Safranine) n'a pas amené de modification notable au point de vue de l'agglutination.

Il est nécessaire maintenant de mettre en regard les uns des autres les faits précédemment acquis. D'une part, les éberthiformes se comportent vis-à-vis des animaux exactement comme l'Eberth et se transforment spontanément en bac. typhiques authentiques; d'autre part, l'Eberth peut être artificiellement ramené au type éberthiforme. Le non-agglutinable devient agglutinable, l'agglutinable devient non-agglutinable. Il est dès lors infiniment probable que les éberthiformes rencontrés dans la nature, reconnaissent la même origine que les éberthiformes artificiellement reproduits; les uns et les autres sont l'expression d'une modification biologique du bacille typhique au contact de l'organisme infecté ou immunisé (ce qui n'implique aucunement que les éberthiformes ne puissent relever d'une autre étiologie actuellement inconnue).

La seule objection que l'on puisse faire à cette manière de voir, c'est que la transformation doit s'opérer très vite au cours de la fièvre typhoïde humaine, alors qu'elle se produit très lentement dans les conditions expérimentales; mais ces dernières conditions sont tout artificielles, on l'a dit plus haut; le sac de collodion n'est pas la rate, l'organisme du rat n'est pas celui de l'homme, et nous ne voyons guère de moyen pratique de répéter l'expérience telle qu'elle devrait être idéalement faite.

Nous acceptons donc que l'éberthiforme n'est qu'une modification de l'Eberth; modification d'ailleurs temporaire et reconnaissable, grâce à la persistance du pouvoir agglutinogène.

Reste maintenant à interpréter les faits. Dans l'état actuel de nos connaissances générales sur la biologie des microbes, une seule interprétation semble plausible; l'éberthiforme représente un Eberth accoutumé au contact des agglutinines; sa transformation n'est qu'un phénomène d'accoutumance. Sans cesse baigné par des humeurs agglutinogènes, l'Eberth réagit, se laisse de moins en moins influencer par elles, jusqu'à ce

qu'elles arrivent à peine à l'impressionner; à ce moment, le type éberthiforme se trouve réalisé.

Inversement, ce même Eberth accoutumé aux agglutinines, laissé pendant longtemps en dehors de l'organisme sur milieux artificiels, perd progressivement l'accoutumance qu'il avait acquise, chacune des générations successives en abandonnant une part. Il redevient agglutinable et réalise le type de l'Eberth classique, c'est-à-dire l'Eberth habitué aux milieux artificiels. Mais cette transformation *in vitro* ne consiste pas dans l'apparition, dans l'acquisition d'une propriété nouvelle; c'est au contraire la disparition d'une faculté acquise, de l'accoutumance.

On comprend encore facilement pourquoi l'éberthiforme non agglutinable conserve néanmoins son pouvoir agglutinogène. L'agglutination n'exprimant qu'une réaction de l'organisme vis-à-vis de l'infection éberthienne, l'éberthiforme suscite la production des agglutinines parce qu'il est virulent et souvent très virulent, mais le sérum produit ne l'influence pas, parce qu'il est habitué à ne plus souffrir de son contact.

III. — BACILLES TYPHIQUES HYPERAGGLUTINABLES D'EMBLÉE

Les bacilles de ce genre ont déjà été signalés. On a même écrit que l'Eberth type pouvait être de moitié moins agglutinable que certains bacilles prélevés chez le typhique. Le fait est possible; mais n'ayant pu constater jusqu'ici de différences aussi considérables, nous sommes tenté de croire qu'il s'est glissé une erreur de technique: l'Eb. pris pour type étant peu agglutinable, ou bien plutôt la culture du bacille en expérience étant moins luxuriante que celle de l'Eb. type (fait fréquent chez les bac. typhiques récemment extraits de l'organisme).

Dans une pulpe splénique extraite 4 heures *post mortem*, on trouva un bacille (Bac. S, voir plus haut) présentant tous les caractères connus de l'Eberth sauf deux: légère coloration des cultures sur pomme de terre; exagération peu marquée de l'aptitude agglutinative, $RA = 1,25$. On voit que la différence est minime: cette variation en plus, et nous n'en avons qu'un exemple, ne rappelle en rien les variations en moins étudiées déjà. D'ailleurs après quelques cultures on trouve $RA = 1$.

Par inoculation à l'animal, ce Bac. S se comporte comme l'Eb., le sérum obtenu est identique au sérum typhique ; avec Eb. type : $RA = 1$; avec Eb. S, $RA = 1, 25$. Comparé à celui de l'Eb. type, le pouvoir agglutinogène du Bac. S est beaucoup plus élevé, il est par contre sensiblement égal (un peu supérieur) à celui de l'Eb. T, non agglutinable, provenant de la même rate.

V. — TRANSFORMATION DE L'EBERTH TYPE EN EBERTH HYPERAGGLUTINABLE

Une telle transformation ne se produit que d'une manière irrégulière. Un Eberth type mis en sac pendant 15 jours sur un animal à peine immunisé, présente une légère augmentation de l'aptitude agglutinative, $RA = 1,20$. Différence légère, à peine appréciable et d'ailleurs passagère.

CONCLUSIONS

L'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth est variable ; on peut rencontrer des bacilles plus ou moins agglutinables que l'Eberth type.

Les variations en plus sont légères et fugaces.

Beaucoup plus importantes sont les variations en moins. On rencontre en effet dans la nature, rarement dans les eaux, couramment chez les typhiques, des bacilles répondant exactement au type Eberth, mais qui sont peu ou pas agglutinés par le sérum typhique (bacilles éberthiformes). Ces microbes se comportent comme l'Eberth vis-à-vis de l'animal ; les sérums éberthiformes présentent les propriétés du sérum typhique. Conservés en tube clos, les éberthiformes se transforment spontanément en bacilles typhiques authentiques, très agglutinables.

D'un autre côté, l'Eberth. type, maintenu pendant longtemps au contact d'un organisme immunisé, se laisse de moins en moins agglutiner par le sérum, et finalement se comporte exactement comme les éberthiformes.

Cette double expérience inverse autorise à conclure que les éberthiformes représentent une forme de bacille d'Eberth, modifié par un long séjour dans un organisme infecté ou immunisé. Cette modification n'est qu'un phénomène d'accoutumance.

INFECTION SECONDAIRE PAR LE *B. MESENTERICUS* AU COURS DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE

PAR M^r E. SACQUÉPÉE.

Médecin aide-major de 1^{re} Classe,
Chef du laboratoire militaire de Bactériologie de Rennes.

Saprophyte banal, le *b. mesentericus* fait partie de la flore bactérienne si variée de l'intestin, à l'état normal comme à l'état pathologique. Sa présence fréquente en ce milieu, l'insensibilité de l'animal à son égard, l'absence de toute connexion apparente avec les états morbides de l'organisme humain, l'ont fait considérer jusqu'à présent comme un hôte au moins inoffensif, et peut-être utile à la digestion.

Expérimentalement cependant, M. Vincent¹ est parvenu à rendre pathogène pour l'animal cette bactérie ordinairement si bien supportée par lui sans dommage apparent. Par des passages successifs chez le cobaye, le *mesentericus* s'accoutume à ce milieu inhospitalier, s'y cultive, et finalement triomphe de sa résistance, et va jusqu'à tuer les animaux inoculés.

Chez l'homme, pareille virulence n'a guère été signalée. Cependant, à la faveur d'une infection préalable, le *mesentericus* peut franchir la barrière intestinale, envahir l'organisme pour son propre compte, et déterminer des symptômes qui paraissent bien liés à sa présence. On en jugera par les deux observations suivantes.

OBS. I. — *Fièvre typhoïde, accès intermittents ; pneumonie ; guérison.* — S..., 23 ans. L'affection débute par céphalée, épistaxis, insomnie, diarrhée.

Entré à l'hôpital le 8^e jour ; à ce moment taches rosées, langue rôtie, météorisme abdominal, inappétence, diarrhée, prostration, légère stupeur, céphalée, insomnie, tuméfaction de la rate, fièvre élevée (voir la courbe ci-dessous) séro-diagnostic positif ; diazo-réaction manifeste.

Traitement classique : régime lacté, bains froids, antiseptiques intestinaux.

Evolution banale jusqu'au 19^e jour. A cette date apparaissent des accès

1. Aptitudes pathogènes des Saprophytes. Ces *Annales*, 1898, p. 785.

franchement intermittents, durant trois à six heures, caractérisés par les stades classiques : frissons, chaleur, sueurs. Mêmes accès les jours suivants. Les écarts de température sont considérables, comme l'indique la courbe. (Ecart maximum le 25^e jour, de 35°8 à 8 heures du matin, à 41°6 à 3 heures du soir.)

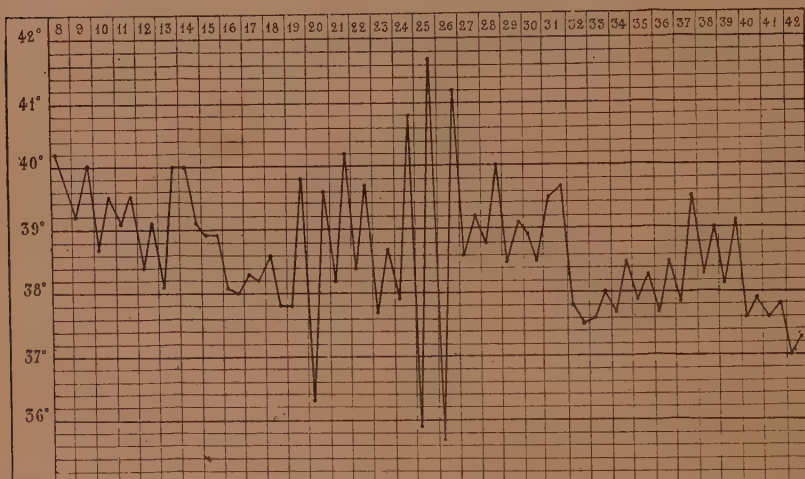


Fig. 4.

Examen du sang quatre fois de suite, avant et pendant l'accès : il n'y a pas d'hématozoaires; le sujet n'a jamais eu de fièvres intermittentes. Le sang, extrait de la veine le 23^e jour, donne en culture du mesentericus modifié, étudié plus loin.

Au 26^e jour, apparition d'un foyer de pneumonie franche. Dans les crachats à l'examen direct, pneumocoque, long bacille prenant le Gram; pas de bacilles décolorés par le Gram. Les mêmes crachats inoculés au lapin tuent l'animal par septicémie pneumococcique; en culture ils donnent le même microbe que le sang de la veine, mesentericus modifié. La pneumonie se résout péniblement. Convalescence traînante et finalement guérison.

OBS. II. — Fièvre typhoïde ataxo-adynamique, avec accès intermittents irréguliers; guérison.

C..., 22 ans. Début par céphalée, épistaxis et insomnie : diarrhée au 3^e jour.

Entrée à l'hôpital le 4^e jour; à ce moment : langue sèche, tympanisme abdominal, inappétence, diarrhée, tuméfaction de la rate, prostration : insomnie. Diazo-réaction intense; séro-diagnostic négatif.

Au 9^e jour, taches rosées; au 10^e, séro-diagnostic positif.

Traitement classique : lait, bains froids, naphtol.

Évolution sévère sous la forme ataxo-adynamique.

A partir du 18^e jour, surviennent des accès intermittents irréguliers.

revenant tous les deux ou trois jours, avec 3 ou 6 heures de durée, toujours l'après-midi ; frissons et chaleur intenses, sueurs peu abondantes.

L'examen répété du sang ne révèle pas d'hématozoaires ; le sujet n'est pas paludéen.

La culture du sang prélevé dans la veine donne un *mesentericus* modifié, étudié ci-dessous.

Après le 27^e jour, l'affection continue son évolution ordinaire et se termine par la guérison.

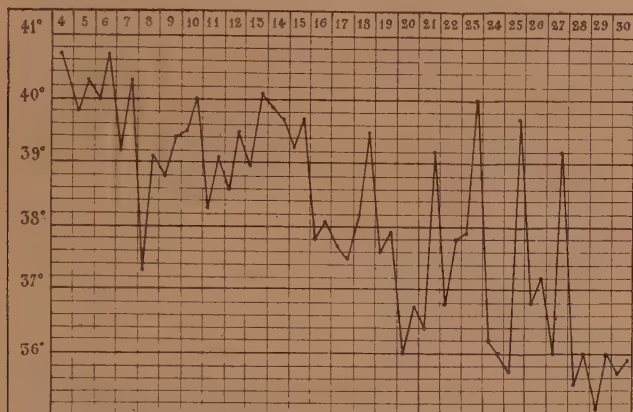


Fig. 2.

En résumé, un *mesentericus* modifié a pu être rencontré chez deux typhiques, dans le sang chez l'un, dans le sang et les crachats chez l'autre. Ces deux malades n'avaient d'autre particularité commune que la modification de l'évolution normale de la dothientérie par les accès intermittents : ces accès manquaient totalement chez vingt autres typhiques du service ; et le sang examiné chez onze d'entre eux, mis en culture, ne renfermait pas de microbes.

Provenant de S... ou de C... le *mesentericus* modifié s'est comporté de façon à peu près identique en dehors de l'organisme.

En première culture, le bouillon se trouble uniformément, fortement, avec voile léger à la surface ; sur gélose, couche peu épaisse, blanc grisâtre, bleutée, dépassant de 3 ou 4 millimètres la strie d'inoculation ; sur pomme de terre, coloration brun-jaunâtre sur toute la surface du milieu, avec culture peu abondante, en glaçure chez C... ; plus épaisse chez S... ; ajoutons à cela que le sérum des deux malades agglutine fortement ce microbe à 1 pour 50. L'ensemble de ces caractères fait

penser au coli ou à l'Eberth ; mais le bacille est long, épais, prend le Gram et forme des spores après 6 ou 8 jours de culture, ce n'est donc ni l'Eberth ni le coli.

Dans les cultures successives, l'aspect se modifie rapidement. Le 3^e passage sur pomme de terre laisse voir déjà quelques petites crêtes saillantes à la partie supérieure du milieu, légèrement desséchée.

Progressivement, chaque génération nouvelle modifie les caractères primitifs, et dès le huitième passage la modification est complète et persistante. Dès lors, le bouillon est à peine troublé dans la profondeur ; la culture se fait presque exclusivement à la surface, sous forme d'un voile ridé, se reformant sitôt détruit ; la surface de la gélose est envahie tout entière par une culture opaque, hérissée de plis fortement saillants ; sur pomme de terre, développement exubérant, gaufrage régulier marqué de crêtes hautes et épaisses, toujours colorées en brun. Au microscope enfin, même bacille long prenant le Gram ; mais cette fois, les spores se forment très vite, dès les premiers jours. C'est l'aspect classique du *mesentericus*.

Avant d'aller plus loin, il est intéressant de constater que les caractères du *mesentericus* sortant de l'organisme étaient à peu près identiques à ceux que signale M. Vincent à la suite de passages répétés chez le cobaye.

Franchement agglutinées à 1 pour 50 par le sérum des deux malades précédents, les cultures primitives n'étaient aucunement modifiées par le sérum d'autres typhiques à la dose de 1 pour 15.

Inoculé à l'animal, même en quantité assez considérable, (3 c. c. dans le péritoine du cobaye), le *mesentericus* modifié ne le tue pas ; mais il provoque une forte élévation thermique. Le bacille est activement englobé par les phagocytes ; en sacrifiant l'animal après quelques jours, on a toujours constaté des lésions en foyer : abcès du mésentère, péritonite localisée ; dans le pus, on retrouve le bacille libre, vivant, très abondant. Par association avec un Eberth fortement atténué, on ne constate pas d'exaltation marquée de la virulence.

En résumé, on peut rencontrer chez certains typhoïdiques un bacille méconnaissable dans ses premiers développements sur milieux artificiels, mais susceptible de modifier rapidement

ses caractères primitifs, jusqu'à revêtir l'aspect du *mesentericus*, et qui est un *mesentericus* modifié : les cultures successives lui permettent de retrouver son type ancestral.

Quel a été son rôle dans la maladie ? Le sang puisé chez onze typhiques, d'évolution banale, n'a rien donné en culture ; au contraire, le sang prélevé chez deux typhiques présentant des accès intermittents, au cours de ces accès, renfermait un *mesentericus* modifié agglutiné par le sérum des mêmes sujets. En présence de cette constatation, il est bien difficile de se résoudre à admettre qu'il y ait là une simple coïncidence de hasard ; il est plus conforme à la logique d'accepter que le *mesentericus* est venu ajouter son appoint à l'infection typhoïdique, et, greffant ses effets sur les réactions dues à l'Eberth, réaliser un syndrome tout spécial et dès longtemps décrit. Ceci ne veut pas dire que dans d'autres cas analogues, on ne puisse mettre en cause des microbes tout différents ; un syndrome uniforme peut traduire mille impressions diverses.

L'absence ou le faible degré du pouvoir pathogène pour l'animal prouve simplement qu'un microbe peut être virulent chez l'homme et inoffensif chez les animaux de laboratoire, fait depuis longtemps connu.

Il est donc évident qu'un saprophyte banal, le *mesentericus*, est capable d'évoluer pour son propre compte dans le milieu humain à la faveur d'une autre infection plus virulente. D'où vient ce *mesentericus* ? Probablement de l'intestin qu'il peut franchir à travers de larges ulcérations. Le fait est d'autant plus probable que, dans les diarrhées saisonnières de l'été dernier, nous avons constaté dans les selles une pullulation excessive de ce même microbe ; et l'épidémie de fièvre typhoïde ayant succédé immédiatement à ces diarrhées, il y a lieu de penser que le *mesentericus* a pu s'habituer peu à peu au contact de l'organisme, en modifiant tout ensemble ses caractères morphologiques et biologiques. Des passages successifs par l'intestin humain transforment le banal saprophyte en pathogène éventuel : répétition, chez l'homme, d'une expérience vérifiée par avance chez l'animal. Ce n'est là d'ailleurs qu'une hypothèse ; d'autres faits sont nécessaires pour lui permettre de prendre corps.

SUR LES PROPRIÉTÉS BACTÉRICIDES DU SÉRUM SANGUIN

DANS LE COURS DES MALADIES

PAR M. LE D^r OSTRIANINE, de KHARKOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les propriétés bactéricides du sang des animaux sains furent constatées pour la première fois par *Fodor*. Il fit cette constatation sur le sang des lapins vis-à-vis des bactériidies charbonneuses. Ces faits ont été confirmés par de nombreuses expériences de *Nuttall*, *Niessen* (1), *Behring* et *Buchner*. Ce dernier démontra que non seulement le sang, mais aussi le sérum sanguin possède cette propriété bactéricide.

Le sang tue les bactériidies, dit *Buchner*, seulement pendant les premières heures, ensuite il devient un excellent milieu de culture pour elles, grâce à la destruction des globules sanguins.

Cette propriété bactéricide du sérum a été attribuée par *Buchner* à une substance, qu'il désigna sous le nom d'*alexine*.

Nuttall et plus tard *Buchner* trouvèrent que la propriété bactéricide du sérum disparaît si l'on porte ce dernier à 55°.

Flügge et *Buchner* créèrent la théorie humorale de l'immunité. D'après cette théorie, ce seraient les alexines qui protégeraient l'organisme contre l'infection. Ces auteurs supposaient que ces bactéries circulant dans le sang rencontraient les alexines qui les détruisaient.

Dans ces derniers temps, *Buchner* (2) abandonna sa théorie de l'immunité purement humorale. D'après lui, c'est seulement dans des cas exceptionnels qu'on pouvait expliquer la défense de l'organisme par les alexines seules, à l'exclusion de l'action des leucocytes.

Les recherches ont mis en évidence un grand nombre de faits qui sont en contradiction avec la théorie qui attribue la défense

de l'organisme à des alexines. Ainsi le lapin, dont le sérum possède un pouvoir bactéricide vis-à-vis les bactériidies du charbon, contracte néanmoins très facilement cette maladie.

Il existe un certain nombre d'autres faits du même genre.

Metchnikoff (4) a émis le premier la supposition que la propriété bactéricide du sérum pourrait bien être d'origine leucocytaire. *Buchner* présenta de nombreux faits à l'appui de cette hypothèse, et avança l'opinion que les alexines seraient sécrétées par les leucocytes pendant leur vie.

En 1889, *Metchnikoff* (5) montra que pendant la vie le sang ne possède pas ces substances bactéricides, mais que ces substances se forment hors de l'organisme, *in vitro*, et sont éliminées par les leucocytes au moment de leur destruction.

Bordet (6) confirma ces observations, et démontra la corrélation indubitable qui existe entre la leucocytose d'une part et le pouvoir bactéricide du sérum sanguin de l'autre.

Si l'on admettait la théorie humorale d'après laquelle les alexines seraient les défenseurs de l'organisme contre l'infection, comment expliquer que les animaux possédant à l'état normal des alexines sont très sensibles aux infections, tandis que ceux qui en sont privés sont réfractaires? Evidemment, il aurait fallu expliquer cela dans le premier cas par la diminution et même la disparition des alexines, et dans le second par leur formation. Afin d'éclaircir cette question, beaucoup d'observateurs ont fait un grand nombre de recherches. Les uns trouvèrent que pendant la durée de l'infection les propriétés bactéricides du sérum sanguin diminuaient ou même disparaissaient complètement (*Niessen, Lubarsch, Székely et Szana, Bastin, Denys et Kaïsine*); d'autres ne constatèrent aucun changement.

Ainsi *Conradi* (12), après avoir injecté des bactériidies charbonneuses, sous la peau ou dans les veines de lapins, trouva que la propriété bactéricide du sérum ne subissait aucun changement ni pendant la première période, c'est-à-dire pendant le processus local, ni pendant la seconde, lorsque le sang contient de nombreuses bactériidies. Il observa les mêmes faits chez le chien.

Cependant, d'après la théorie humorale, on devrait s'attendre à voir, pendant l'infection par le charbon, une diminution de la quantité d'alexines chez les lapins qui contractent facilement cette maladie, et par contre, une augmentation chez les chiens

qui sont réfractaires au charbon. Or, en réalité il n'en est rien ! Les expériences de Conradi démontrèrent que les alexines restent sans changement chez les uns comme chez les autres.

La question de l'action des alexines dans le cours des maladies présente cependant un grand intérêt. On pourrait y trouver peut-être l'explication de l'insuccès de l'emploi thérapeutique des sérums bactéricides.

Wassermann consacre à cette étude son travail intitulé : « *Über neue Versuche auf dem Gebiete der Serumtherapie* » (13).

Les sérums thérapeutiques se divisent en sérums antitoxiques et en sérums bactéricides. Les premiers renferment des substances spécifiques agissant contre les toxines, les seconds n'ont aucune action sur les toxines, mais agissent sur les microbes mêmes, qu'ils tuent et dissolvent.

Les études de Bordet (14), confirmées par les recherches de Ehrlich et Morgenroth (15), sur le sérum hémolytique, démontrèrent que les actions bactéricide et dissolvante des sérums appartiennent à deux agents distincts : 1) *Immunkörper* d'après Ehrlich ou *substance sensibilisatrice* d'après Bordet et 2) *complément* d'après Ehrlich ou *alexine* d'après Bordet. Cette dernière substance se trouve dans le sérum sanguin de l'animal neuf, tandis que la première se forme pendant l'immunisation ou bien après la guérison.

L'alexine est une sorte de ferment digestif, qui ne peut pas agir sur les bactéries sans le concours de l'autre agent, qui le rend sensible à l'action bactéricide, et sert, pour ainsi dire, de trait d'union entre l'alexine et les bactéries.

Donc, pour que l'emploi des sérums bactéricides puisse être suivi de succès, il faut mettre en présence des quantités suffisantes de substance sensibilisatrice et d'alexines. Si l'un de ces agents n'est pas en quantité suffisante, l'effet thérapeutique n'aura pas lieu.

Wassermann suppose que si les sérums bactéricides échouent, c'est parce que l'organisme malade dépense une grande partie de l'alexine se trouvant normalement dans le sérum, et par conséquent la *substance sensibilisatrice* (*Immunkörper*), introduite en quantité suffisante avec le sérum bactéricide, reste sans action, ne trouvant pas d'alexine en quantité nécessaire.

L'organisme malade dépense-t-il réellement toute son alexine qui existe à l'état normal?

Afin de résoudre cette question, j'ai entrepris une série de recherches sur les propriétés bactéricides du sérum sanguin dans le cours de l'infection charbonneuse chez les lapins, du choléra chez les cobayes, et enfin à l'état normal chez les uns et chez les autres.

I

EFFET BACTÉRICIDE DU SÉRUM SANGUIN DES LAPINS SUR LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE A L'ÉTAT NORMAL ET PENDANT L'INFECTION CHARBONNEUSE

Je commençais mes expériences par saigner les lapins sains, et 24 heures après je leur faisais une injection hypodermique de culture virulente de charbon. Cette culture, de 16-18 heures, sur gélose, était mélangée avec 10 c. c. de solution physiologique du sel marin. Chaque injection contenait 1/10 de cette émulsion. La maladie durait, généralement, de 36 à 60 heures.

Je pratiquais la seconde saignée le premier ou le deuxième jour de la maladie, 12-20 heures avant la mort, parfois quelques heures seulement avant, et enfin même pendant l'agonie. Je gardais le sang pendant 24 heures dans la glacière pour laisser déposer le sérum. 1 c. c. de ce sérum étaitensemencé avec une anse de fil de platine plongée dans une culture de charbon de 16-18 heures sur gélosé.

L'effet bactéricide était étudié au moyen des boîtes de Pétri sur gélose. Le nombre de bactériesensemencées n'était pas élevé; on en comptait généralement de 200 à 2,000.

Lorsqu'on examine le tableau A, on constate que le sérum des lapins sains possède des propriétés bactéricides incontestables; dans deux expériences cependant (7, 12) le sérum n'en avait aucune.

Cette propriété bactéricide était manifeste dans la plupart des expériences, pendant le premier jour seulement; dès le deuxième on voyait déjà des bactéries se développer (4, 11).

L'effet bactéricide du sérum des lapins atteints de charbon a été étudié dans la plupart de mes cas, à la période d'infection très avancée, lorsque le sang charrie de grandes quantités

de bactéries, souvent quelques heures seulement avant la mort, et parfois même pendant l'agonie de l'animal. Je n'ai jamais constaté non seulement la disparition, mais même la diminution de la propriété bactéricide, sauf dans l'expérience 11, qui a été faite avec du sang, et non avec du sérum.

Le sérum des lapins atteints de charbon possède donc un pouvoir bactéricide aussi fort que le sérum normal; chez les premiers cette propriété paraissait même légèrement accrue, ou bien elle se manifestait dans les circonstances, très rares d'ailleurs, où précédemment elle avait fait défaut.

Puisque nous avons jugé de la force bactéricide d'après le nombre des colonies, il a fallu aussi se demander si l'agglutination ne serait pas la cause de la diminution du nombre de colonies? Les expériences 7, 8, 9, 12 démontrent qu'il est impossible de mettre cette diminution exclusivement sur le compte de l'agglutination. Ce n'est que rarement que cette dernière exerce en effet son action. Ainsi, nous voyons, dans les expériences 7 et 8, que le sérum ne possède point au cours de l'infection charbonneuse de propriété agglutinante vis-à-vis des bactériidies, et cependant l'effet bactéricide existe (diminution du nombre de colonies); dans deux autres expériences (9 et 12) l'agglutination se manifeste, mais d'une façon très peu prononcée. On sait que le sérum, chauffé pendant une 1/2 heure à 56°, perd sa propriété bactéricide.

En effet, lorsque nous avons chauffé pendant une 1/2 heure à 56° le sérum des lapins sains, nous avons constaté cette disparition; mais nous n'avons observé rien de pareil avec le sérum pris sur les mêmes lapins après qu'ils ont été inoculés du charbon. Ce fait paraît être contradictoire. Cependant il est facile de l'expliquer. C'est que, lorsqu'on chauffe pendant une 1/2 heure à 56° le sérum des lapins atteints de charbon, ce sérum acquiert une propriété agglutinante assez notable (il agglutine en proportion de 1 : 10). Cette propriété se manifeste habituellement pendant les premières heures qui suivent la préparation du mélange (le sérum étant à l'étuve). Nous avons dit plus haut que le sérum des lapins atteints de charbon possédait quelquefois la propriété agglutinante même sans être chauffé; le chauffage pendant une 1/2 heure à 56° augmente cette propriété. Par conséquent, dans ces cas, c'est l'agglutination qui cause la diminution

du nombre de colonies, comme on aurait pu le supposer, et non la persistance de la propriété bactéricide, malgré le chauffage.

Si l'on chauffe le sérum des lapins atteints de charbon pendant une heure à 65°, la propriété agglutinante ainsi que la propriété bactéricide disparaissent toutes les deux.

L'origine leucocytaire de la propriété bactéricide du sérum résulte des travaux de Metchnikoff et de Bordet. Nos expériences ne font que la confirmer. Nous n'avons jamais constaté, pendant l'infection, ni la diminution de la propriété bactéricide, ni celle du nombre de leucocytes. Lorsqu'on compare le nombre de leucocytes à l'état normal avec celui que l'on constate pendant l'infection par le charbon, on constate, dans la plupart des cas d'infection charbonneuse, une faible augmentation du nombre de leucocytes, ainsi qu'une légère recrudescence de la propriété bactéricide (Exp. 7 et 8).

II

EFFET BACTÉRICIDE DU SÉRUM SANGUIN DES COBAYES SUR LE VIBRION DU CHOLÉRA A L'ÉTAT SAIN ET PENDANT L'INFECTION CHOLÉRIQUE

Ces expériences ont été faites de la même façon que les précédentes.

J'injectais aux animaux, dans la cavité abdominale, une émulsion de culture cholérique de 16-18 heures, sur gélose. Les doses variaient selon la virulence de la culture.

Les expériences ont été faites avec un vibrion de *Nasik*. Cette culture étant trop virulente, tous mes animaux périrent dans un laps de temps trop court pour que je puisse faire des observations. C'est pourquoi dans la suite je me suis servi d'une culture *cholérique* moins virulente (*Prusse orientale*). L'injection de cette dernière culture provoquait un état morbide dont la durée était de 1 à 8 jours. J'injectais les cobayes 24 heures après la première saignée. On n'observait aucun changement dans la leucocytose après cette première saignée.

Dans la première série de six expériences pour lesquelles je me suis servi de la culture du choléra *Nasik*, la maladie ne durait habituellement que 4-7 heures. Dans deux expériences seulement elle avait duré davantage; dans l'exp. 6 elle dura 48 heures, et dans l'exp. 2, 8 jours.

Lorsque l'évolution de la maladie est rapide, la propriété bactéricide ne subit aucun changement (Exp. 1, 3, 5), sauf dans une seule expérience N° 4, où le sang a été pris pendant l'agonie de l'animal.

La saignée a été faite une demi-heure ou 1 heure avant la mort. Pas de changement non plus dans la leucocytose. Pendant l'agonie (Exp. 4) il y a eu diminution du nombre de leucocytes, ce qui explique la diminution de l'effet bactéricide.

Dans le choléra à évolution plus longue (Exp. 2 et 6), on ne constata pas non plus, ni pendant les premières heures (5 h.), ni à l'apogée de la maladie, de changements dans le pouvoir bactéricide. Le nombre de leucocytes était normal.

Dans la seconde série d'expériences faites avec la culture de *Prusse orientale*, l'évolution de la maladie fut plus lente (de 24 heures à 7 jours); le pouvoir bactéricide du sérum ne subit aucun changement, même à un stade très avancé de la maladie, lorsqu'on constatait des vibrions dans le sang, et lorsque la température de 38°,7, 38°,5, tombait à 37° et même 34°. Pas de changement non plus au point de vue de la leucocytose.

Dans les cas où la propriété bactéricide faisait défaut à l'état normal, elle manquait aussi pendant la maladie (Exp. 13, 14). Une fois (Exp. 7), où la maladie avait duré 24 heures, on constata pendant l'agonie une diminution de la propriété bactéricide. On observa dans ce cas aussi une diminution du nombre de leucocytes de 8,400 à 5,200.

Dans l'infection cholérique d'une certaine durée, la propriété bactéricide non seulement ne diminue pas, mais même elle augmente légèrement, ainsi qu'on le voit dans l'exp. 8. Dans ce cas la maladie avait duré 7 jours. On n'observa aucun changement dans la propriété bactéricide 19 heures après le début de la maladie, mais on constata une légère recrudescence de cette propriété immédiatement après la mort. Les leucocytes n'ont pas été comptés chez ce cobaye avant sa mort.

Le chauffage pendant une demi-heure à 56° détruit la propriété bactéricide du sérum, chez les cobayes sains aussi bien que chez les cobayes atteints de choléra.

Nous pouvons donc conclure que la propriété bactéricide du sérum des lapins atteints de charbon, aussi bien que celle du sérum des cobayes atteints de choléra, ne s'épuise pas pendant

la maladie, et, en plus qu'elle se trouve en relation avec la leucocytose.

Que M. le professeur Metchnikoff veuille bien agréer l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir indiqué le sujet de mon travail et m'avoir guidé par ses conseils éclairés pendant toutes mes recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) NIESSEN. *Zeitschrift für Hygiene*, 1889, B. V, p. 487.
- 2) BUCHNER. XIII^e Congrès international de médecine, Paris 1900, 2-9 août.
- 3) METCHNIKOFF. *L'Immunité*.
- 4) METCHNIKOFF. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887.
- 5) METCHNIKOFF. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889.
- 6) BORDET. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895. N° 6.
- 7) NIESSEN. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1889. B. V.
- 8) LUBARSCHE. Cit. CONRADI. *Zeitschrift für Hygiene*, 1900, Bd. 34, H° 2.
- 9) SZÉKELY et SZANA. *Centralbl. f. Bacteriol.*, 1892, B. XII.
- 10) BASTIN. *La Cellule*, t. VIII, p. 383, 1892.
- 11) DENYS et KAISIN. *La Cellule*, t. IX, p. 337, 1893.
- 12) CONRADI, *Zeitschrift für Hygiene*, 1900, Bd. 34, H° 2.
- 13) WASSERMANN. *Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1900. N° 18.
- 14) BORDET. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, t. XII, n° 10; 1899, t. XIII, n° 4.
- 15) EHRLICH et MORGENROTH. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1899, n° 1, n° 22.

EXPÉRIENCES

Dans les tableaux qui suivent, on a résumé les données et les résultats principaux de chaque expérience.

- SNA signifie sérum naturel des animaux sains, non chauffé.
 SNI — le même sérum chauffé 30 minutes à 56°.
 SMA — sérum des animaux malades, non chauffé.
 SMI — le même sérum chauffé 30 minutes à 56°.

TABEAU A
EFFET BACTÉRICIDE, SUR LA BACTÉRIE, DU SÉRUM DE LAPIN NORMAL ET DE LAPIN CHARBONNEUX

Numéro de l'expérience.	Nombre des colonies à diverses époques après l'ensemencement.						Leucocytes av. ségnée. lapin sain. lapin malade	Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	24 h.	48 h.			Ap. injection.	Avant mort.	
N° 1. SNA SNI SMA SMI	780	68	600	∞					Pendant l'agonie.	45 heures
	840	800	850	∞	900					
	272	35	"	76	144					
	278	44	"	14						
N° 2. SNA SNI SMA SMI	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	24 h.	48 h.	9200	40 heures	9 heures	49 heures
	343	92	20	10	600	∞				
	735	2000	2890	7500	∞	∞				
	414	3	"	"	4	∞				
N° 3. SNA SNI SMA SMI	4400	496	90	96	∞					
	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	24 h.	48 h.	9600	40 heures	4 h. 30'	44 h. 30'
	332	52	104	227	∞					
	900	642	2850	11000	∞					
N° 4. SNA SNI SMA SMI	270	26	10	13	2	∞				
	770	34	6	5	∞					
	0 h.	1 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.	12000	42 heures	8 heures	50 heures
	414	390	13	4	4	1270				
N° 5. SNA SNI SMA SMI	312	180	4	2	2	183				
	200	77	40	16	9	∞				
	410	482	1512	3580	∞					
	0 h.	3 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.	17200	42 heures	18 heures	60 heures
N° 6. SNA SNI SMA SMI	200	22	9	4	45	∞	8800	42 heures	48 heures	
	427	244	615	275	530	∞				
	241	21	40	44	8	4				
	256	360	392	325	∞					
N° 6. SNA SNI SMA SMI	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.	23600	24 heures	12 heures	36 heures
	707	433	50	61	9	∞				
	974	344	285	1443	4900	∞				
	2370	87	9	2	3	∞				
SMI	640	71	81	437	445	∞				

TABLEAU A (suite.)

Numéro de l'expérience.	Nombre des colonies à diverses époques après l'ensemencement.					Agglutination.	Leucocytes av. saignée.		Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	2 h.	5 h.	8 h.	24 h.		Lapin sain.	Lapin malade.	Ap. injection.	Avant mort.	
N° 7. SNA SNI SMA SMI	1000	755	1512	∞	∞	0 à 4 : 1	9600	16800	23 heures	20 heures	43 heures
	900	900	2850	∞	1	4 : 1					
	846	26	45	8	36	1 : 10					
	370	35	19								
N° 8. SNA SNI SMA SMI	800	53	40	8	∞	0 à 4 : 1	9600	21200	23 heures	13 heures	36 heures
	850	945	∞	∞	∞	0 à 4 : 1					
	577	35	40	∞	∞	1 : 10					
	980	325	310								
N° 9. SNA SNI SMA SMI	230	4	4	2	∞	0 à 4 : 1	9600	42000	21 h. 30'	20 h. 30'	42 heures
	316	461	750	2350	1000	4 : 10					
	580	262	455	35	∞						
	450	281	160	682	∞						
N° 10. SNA SNI	415	41	∞	∞	320	0 à 4 : 1					
	392	460	686	4270	∞						
	276	5	1	1	2	0				0	22 heures
	460	400	570	314	∞	f. à 4 : 1	8000	»	22 heures		
N° 11. SNA SNI SMA SMI	4500	5229	∞	∞	∞	0					
	980	2110	∞	∞	∞	0					
	534	690	2670	5580	∞	0 à 4 : 1					
	593	4038	2020	2520	∞	f. à 4 : 1					
N° 12. SNA SNI SMA SMI SM-65°	76	24	∞	2	∞	F à 4 : 10	8800	45600	20 heures	52 heures	72 heures
	260	2	∞	950	∞	0					
	260	∞	543								

Les lapins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, avaient tous au moment de la saignée beaucoup de bactériidies dans le sang.

Les lapins 7 et 9 n'en avaient pas.

Le lapin 10 est mort pendant la nuit, on n'a pu en retirer du sérum, et l'expérience est faite avec le sang. L'agglomération du sang chauffé se fait bien à 4 : 10, celle au sang non chauffé est nulle.

Le sang du lapin 11 est extrait du cœur immédiatement après la mort. On n'a pu obtenir le sérum et l'expérience est faite avec le sang.

TABEAU B
EFFET BACTÉRICIDE, SUR LE BACILLE DU CHOLÉRA, DU SÉRUM DU COBAYE NORMAL ET DU COBAYE INFECTÉ.

Numéro de l'expérience.	Nombre de colonies à diverses époques après l'ensemencement.					Leucocytes chez les cobayes.			Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	Normal avant saignée.	Traité avant saignée.	Malade avant saignée.	Ap. infection.	Avant mort.	
N° 1. SNA SNI SMA SMI	18000	∞	7000	∞	∞	8400	8800	?	3 h. 40'	20'	4 heures
	45000	6	58	2000							
	12700	∞									
	8000										
N° 2. SNA SNI SMA SMI	440	1	5	2	∞	7000	»	6800	5 h. 30'		8 jours
	2000	∞	5	8							
	180	1									
	1228	∞									
N° 3. SNA SNI SMA SMI	2350	2	1	»	∞	8800	»	6000	4 h. 30'	30'	5 heures
	2420	∞	900	∞							
	1270	50									
	2286	∞									
N° 4. SNA SNI SMA SMI	4063	47	2080	∞	∞	8800	»	5600	5 h. 30'		5 h. 30'
	3400	∞	∞								
	1868	840	∞								
	1780	∞									
N° 5. SNA SNI SMA SMI	500	4	»	2	∞				6 heures	4 heure	7 heures
	504	∞	»								
	360	∞	»								
	330	∞	»								

TABLEAU B (suite.)

Numéro de l'expérience.	Nombre de colonies à diverses époques après ensemencement.					Leucocytes chez les cobayes.				Date de la saignée.	Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	Normal avant saignée.	Traité av. Infection.	Traité ap. Infection.	Ap. Infection.		
N° 6. SNA SNI SVA SMI	2300 2730 4500 5400	" ∞ » ∞	"			7600	8800	13200	15 heures	33 heures	48 heures
N° 7. SNA SNI SMA SMI	4826 5461 250 92	" ∞ 330 1960	" 820 ∞	100 ∞	∞	8100	6400	5200	24 heures	Agonie	24 heures
N° 8. SNA SNI SMA SMI	7397 7700 3500 13800	20 ∞ 70 ∞	" 200	65 3450	∞ ∞	7200	7600	6400	19 heures		7 jours
N° 9. SNA SNI SMA SMI	10480 41370 42700 42000	760 ∞ 950 ∞	3200 2030	∞ ∞		12000	12000	10000	48 heures	48 heures	36 heures
N° 10. SNA SNI SMA SMI	6300 4000 6400 7875	1134 ∞ 1400 ∞	380 500	∞ 4	∞	13000	13600	13800	48 heures		6 jours

TABLEAU B (suite.)

Numéro de l'expérience.	Nombre de colonies à diverses époques après l'ensemencement.				Leucocytes chez les cobayes.			Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	Normal avant saignée.	Traité av. infection.	Traité ap. infection.	Ap. infection.	Avant mort.
N° 11. SNA SNI SMA SMI	8000 15000 8570 8200	35 ∞ 41 ∞	30 3 ∞	210 3 ∞	∞ ∞ ∞	40000	10000	12000	17 heures	4 jours 1/2
N° 12. SNA SNI SMA SMI	7660 4600 6980 8980	377 ∞ 30 ∞	16 18 ∞	132 3 ∞	∞ ∞ ∞	8400	10600	10000	17 heures	Guéri
N° 13. SNA SNI SMA SMI	40100 44400 8900 42700	10160 ∞ 4400 ∞	22600 ∞ 4760 ∞	∞ ∞ ∞		8000	8000	?	15 heures	30 heures
N° 14. SNA SNI SMA SMI	41460 48900 12600 ?	12000 ∞ 9450 ?	3000 ∞ 3150 ∞	∞ ∞ ∞		10000	40000	?	16 heures	24 heures

Les cobayes 9, 11, 12 étaient seuls à n'avoir pas de bacilles-virgules dans le sang.

Les autres en avaient beaucoup.

Les cobayes 1 à 6 ont été inoculés avec du choléra Nasik.

Les n° 7 à 14 avec du choléra de la Prusse orientale.

NOTE SUR LA PRODUCTION DE CASÉASE

PAR UN STREPTOTHRIX PARASITE

PAR

E. BODIN

ET

C. LENORMAND

Professeur à l'École de médecine
de Rennes.

Professeur à l'École de médecine
de Rennes.

Dans l'étude que l'un de nous a faite ¹ d'un *Streptothrix* parasite, la forme *Oospora du Microsporum* du cheval ², il a noté la possibilité de cultiver cette mucédinée sur le lait, et a remarqué qu'elle produit dans ce liquide une transformation; mais dans ce premier travail l'aspect microscopique de la culture a seul été indiqué. L'idée nous est venue de chercher si cette transformation du lait n'est pas produite par une diastase analogue à la caséase de M. Duclaux, et, dans ce cas, quelles sont les principales conditions de la fonction diastasigène de la plante.

1°. *Culture de la forme Oospora du Microsporum sur le lait.* — Si l'on sème sur un tube de lait stérilisé des spores de la forme *Oospora du Microsporum*, et que l'on porte la culture à l'étuve à 35°, on voit vers le 4^e ou 5^e jour, au-dessous du bouchon crémeux jaunâtre situé à la partie supérieure du lait, se former une couche séreuse transparente de quelques millimètres de hauteur, qui gagne progressivement la partie inférieure du tube, et l'atteint au bout de 1 mois environ.

Dans une culture en surface, où la couche de lait a une faible épaisseur, la transformation marche beaucoup plus rapidement et paraît complète vers le 15^e jour. A ce moment l'analyse démontre que le lactose et la matière grasse sont restés intacts,

1. E. BODIN, sur la forme *Oospora* (*Streptothrix*) du *Microsporum* du cheval. *Archives de parasit.*, 1899, n° 3, p. 362 et *ibid.*, 1899, n° 4, p. 606.

2. L'action pathogène de cette mucédinée chez le cheval a été démontrée par MM. Lecalvé et Malherbe (*Archiv. de parasit.*, 1899, n° 2, p. 218; 1899, n° 4, p. 489; 1900, n° 1, p. 108.). M. Bosellini vient de montrer son rôle dans l'étiologie d'une lésion à type peladoïde du cuir chevelu chez l'enfant. (*Giorn. italiano delle malat. ven. e. della pelle, Fasc. III.* 1900.)

particularité qui avait déjà été signalée, pour le lactose, par MM. Lecalvé et Malherbe ¹. Quant à la caséine, elle a subi une profonde transformation, elle s'est solubilisée, elle est devenue filtrable à travers une bougie de porcelaine et présente alors les caractères de cette substance à laquelle M. Duclaux a donné le nom de *caséone*.

Voici les résultats que nous avons obtenus en étudiant la disparition progressive de la caséine dans le liquide de culture à l'étuve à 37° ².

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin.....	3 ^{gr} ,780	0 ^{gr} ,
Culture après 48 heures.....	3,700	0,80
— — 4 jours.....	2,050	1,730
— — 5 —.....	2,040	1,740
— — 6 —.....	1,330	2,450
— — 7 —.....	0,590	3,190
— — 8 —.....	0,450	3,330
— — 11 —.....	0,230	3,550
— — 13 —.....	0,140	3,640
— — 14 —.....	0,050	3,730
— — 15 —.....	0,030	3,750
— — 17 —.....	0	3,780

Ces chiffres nous indiquent que la transformation de la caséine se fait assez lentement au début de la culture, elle progresse plus rapidement du 5^e au 10^e jour, et enfin elle se ralentit à ce moment; elle aboutit à la disparition totale de la caséine existant dans le liquide.

II°. *La transformation de la caséine dans les cultures de la forme Oospora du Microsporum est due à une diastase agissant comme la caséase.* — Lorsque l'on prend une culture sur lait de notre champignon, on constate que ce liquide présente rapidement une réaction alcaline. Après les études de M. Duclaux (*Le Lait*, p. 114) on est donc en droit de se demander si la solubilité de la caséine en ce cas n'est pas due à l'alcalinité du milieu. Il n'en

1. L'intégrité de la matière grasse dans les cultures nous a conduit à n'employer dans nos expériences que le lait écrémé aussi complètement que possible. Ce lait contenait encore, suivant les échantillons, de 0^{gr},120 à 0^{gr},160 de matière grasse pour 100.

2. Nous avons dosé directement la caséine inaltérée en la précipitant de son milieu à l'aide de l'acide trichloroacétique. Avec cet acide et en l'employant toujours dans les mêmes conditions de concentration, aussi bien dans les laits témoins que dans ceux soumis à l'expérience, nous avons toujours eu d'excellents résultats. La caséine transformée se trouve représentée par la différence qui existe entre la caséine du témoin et la caséine restant dans le liquide analysé.

est rien, attendu que la combinaison, qui pourrait prendre naissance dans le milieu alcalin, est détruite au moment du traitement par l'acide trichloracétique.

D'ailleurs nous avons fait à ce sujet des expériences qui démontrent que la transformation observée, en ce cas, est bien due à une action diastasique.

Expérience A. — Une culture de la forme *Oospora du Microsporium* sur lait, dans un matras à fond plat, a été laissée à l'étuve à 35° jusqu'à disparition totale de la teinte blanche du lait : à ce moment, le liquide de culture a été filtré sous pression à la bougie Chamberland et recueilli purement; c'est un liquide absolument limpide et offrant la teinte du bouillon concentré.

Ce liquide a été mélangé, en des fioles d'Erleumeyer, dans la proportion de 10 c. c. pour 25 c. c., à du lait écrémé et stérilisé; le mélange a été porté à l'étuve à 40°. Chaque jour l'une des fioles ainsi préparées a été soumise à l'analyse et cela nous a conduit aux résultats suivants :

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin.....	3 ^{sr} , 240	0 ^{sr} .
Au bout de ½ jours.....	2,020	1,220
— 4 —	1,788	1,452
— 6 —	1,784	1,456
— 7 —	1,746	1,494
— 8 —	1,704	1,536
— 9 —	1,664	1,576
— 11 —	1,660	1,580
— 13 —	1,520	1,720
— 15 —	1,480	1,760
— 18 —	1,400	1,840

Aucune action microbienne due à des impuretés ne peut être invoquée en cette expérience.

Il y a donc sécrétion d'une diastase qui se comporte vis-à-vis de la caséine comme la caséase, et que nous désignerons désormais sous ce nom.

EXPÉRIENCE B. — Une seconde expérience a été faite sur le liquide de culture filtré. Elle a consisté à chauffer ce liquide au bain-marie à diverses températures pendant un temps donné (15 minutes); nous avons vu ainsi qu'à 70° déjà ce liquide perd de son activité, et que cette activité diminue rapidement jusqu'à 75°, température à laquelle elle se manifeste encore, mais d'une façon très faible; à 80° l'activité du liquide a disparu complètement et absolument. Voici en effet les chiffres trouvés pour un mélange de 5 c. c. de liquide diastasifère avec 25 c. c. de lait écrémé, laissé 8 jours à l'étuve à 40°.

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin.....	4 ^{sr} ,550	0 ^{sr}
Liquide non chauffé.....	2,044	2,506
— chauffé à 70°.....	2,256	2,294
— — à 75°.....	4,524	0,026
— — à 80°.....	4,550	0

Le caractère diastasique de la réaction est donc nettement accusé¹.

EXPÉRIENCE C. — Enfin nous avons recherché si le liquide diastasique, ayant déjà agi sur la caséine, se retrouve, après une première action, capable de transformer de nouvelles quantités de caséine, propriété que l'on sait appartenir aux diastases en général. A notre connaissance cette expérience n'ayant pas été publiée au sujet de la caséase, nous croyons intéressant de la rapporter ici.

Un liquide de culture de la forme *Oospora* du *Microsporum* (liquide A) plus riche en caséase que ceux qui nous ont servi pour les expériences précédentes, a été filtré au filtre Chamberland et mélangé à du lait écrémé dans la proportion de 1/3; le mélange a été porté à l'étuve à 40° et l'on a constaté, au bout d'un certain temps, la quantité de caséine transformée : puis, lorsque cette quantité a paru fixe, indiquant que l'équilibre de l'action diastasique était produit, ce mélange a été filtré de nouveau au Chamberland (liquide A'), puis mélangé à du lait stérilisé écrémé, en quantité telle que la proportion de diastase soit la même que dans la 1^{re} expérience. Nous avons vu alors l'action diastasique se produire et aboutir à des résultats que l'on peut considérer comme identiques aux premiers, ainsi que l'indiquent les chiffres que nous ont donnés les analyses. La légère différence que l'on observe entre ces chiffres est si faible que l'on peut la négliger. Elle peut s'expliquer d'ailleurs par la seconde filtration que l'on a fait subir au liquide, à travers une bougie Chamberland qui put retenir une petite quantité de diastase.

	Caséine transformée	
	avec le liquide A.	avec le liquide A'.
Au bout de 24 heures.....	2 ^{sr} ,658	2 ^{sr} ,474
— 4 jours.....	3,658	3,631

La déduction très nette qui ressort de cette expérience est donc que l'activité de la caséase ne se trouve ni diminuée, ni affaiblie par une première action sur la caséine.

1. Des essais semblables ont été faits avec d'autres liquides provenant de cultures de notre mucédinée sur d'autres milieux que le lait, liquides qui, comme nous le verrons, sont plus riches en diastase; ces essais nous ont donné des résultats absolument analogues à ceux dont nous venons de parler.

III. *Variations dans la fonction diastasigène de la mucédinée.* —

D'après M. Duclaux, la production de diastase, chez les mucédinées, est une résultante des conditions physiologiques et du mode d'alimentation, fait que M. Laborde a encore mis en lumière dans ses études sur *l'Eurotiosis Gayoni*¹. Il est donc intéressant de rechercher si la forme *Oospora du Microsporium* produit de la caséase sur d'autres milieux nutritifs que sur le lait, si cette production ne varie pas suivant l'aliment offert à la plante, et si elle n'offre pas un rapport avec le développement de cette dernière.

Notre parasite se développe rapidement et abondamment sur les milieux neutres peptonisés et glucosés, et cela nous a conduit à utiliser les cultures sur bouillon neutre peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0 comme liquides diastasifères; dans ces conditions nous avons obtenu une production de caséase beaucoup plus active qu'avec le lait²; de plus nous avons remarqué que la quantité de caséase produite est en relation avec le glucose consommé dans la culture et avec l'état de celle-ci.

Dans un matras à fond plat, la culture de la forme *Oospora du microsporium* se développe assez rapidement à 35° sur bouillon peptonisé et glucosé, couvrant en 8 à 10 jours la presque totalité de la surface libre du liquide d'une couche assez résistante, d'aspect plissé et d'apparence plâtreuse. Il n'y a encore que peu de glucose consommé, et le liquide de culture ne renferme que très peu de caséase; mais si l'on attend plus longtemps, jusqu'au 20^e jour environ, on constate que l'aspect de la culture se modifie; la couche qu'elle forme devient moins résistante et plus mince, se brisant à la moindre agitation du liquide sous-jacent, l'aspect blanc plâtreux devient moins net, puis disparaît presque complètement, et finalement on n'a plus qu'une pellicule mince de couleur grisâtre, avec encore de-ci de-là quelques points plâtreux qui ont persisté. Que l'on vienne à

1. Laborde. Recherches physiol. sur une moisissure nouvelle, *l'Eurotiosis Gayoni*. Th. de la faculté des sciences de Paris, nov. 1896.

2. Afin de pouvoir comparer l'activité de nos liquides diastasifères dans les diverses expériences, nous avons procédé d'une façon analogue à celle qu'indique M. Fernbach pour le dosage de la sucrase, c'est-à-dire que nous avons fait agir, dans des conditions données de température et de réaction du milieu, le liquide diastasifère sur une quantité déterminée de caséine.

Toutes nos expériences ont été faites en milieux présentant une réaction légèrement alcaline et, après divers essais, nous avons adopté la température de 40°, qui nous a paru la plus favorable à l'action diastasique.

faire des prises successives dans le liquide de culture, on notera une diminution progressive du glucose allant jusqu'à la disparition totale de cette substance, et en outre on verra se produire une coloration brune de plus en plus marquée. Au fur et à mesure, la quantité de caséase augmente et paraît à son maximum au moment où le glucose a disparu complètement, et où la plante, présentant des phénomènes d'inanition et de désassimilation, s'est comme flétrie.

Nous donnons ici un résumé de ces faits en un tableau dans lequel les chiffres représentent la caséine transformée, à 40°, dans un lait titrant 4 gr. 220 de caséine, par des liquides de culture sur bouillon neutre peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0, filtrés à la bougie Chamberland. Le liquide n° 1 correspond à une culture d'aspect florissant, dans laquelle il n'y avait que 0 gr. 43 0/0 de glucose consommé; dans le liquide n° 2 le glucose consommé atteignait 1 gr. 62 0/0 et la plante commençait à se flétrir; enfin le liquide n° 3 a été filtré le lendemain du jour où l'on a constaté la disparition complète du glucose : le champignon n'était plus alors représenté que par cette mince pellicule grisâtre dont nous parlions tout à l'heure.

		LIQUIDE de culture n°1.	LIQUIDE de culture n°2	LIQUIDE de culture n°3
Glucose consommé.....		0 ^{gr} ,43	1 ^{gr} ,62	3 ^{gr}
Caséine transformée.	Au bout de 24 heures.	0,038	0,190	2,658
	Au bout de 48 heures.	0,484	1,786	3,290
	Au bout de 3 jours.	0,582	1,668	3,506
	Au bout de 4 jours.	0,618	1,986	3,658

Il n'est pas inutile de faire ressortir combien ces faits sont analogues à ceux que M. Fernbach¹ a signalés pour l'*Aspergillus* et M. Laborde pour l'*Eurotiopsis Gayoni*.

1. FERNBACH, *Th. de la Faculté des sciences de Paris*, décembre 1890.

Les chiffres suivants montreront combien la caséase que donne notre champignon sur le bouillon neutre peptonisé et glucosé est plus active que celle qu'il produit sur le lait écrémé.

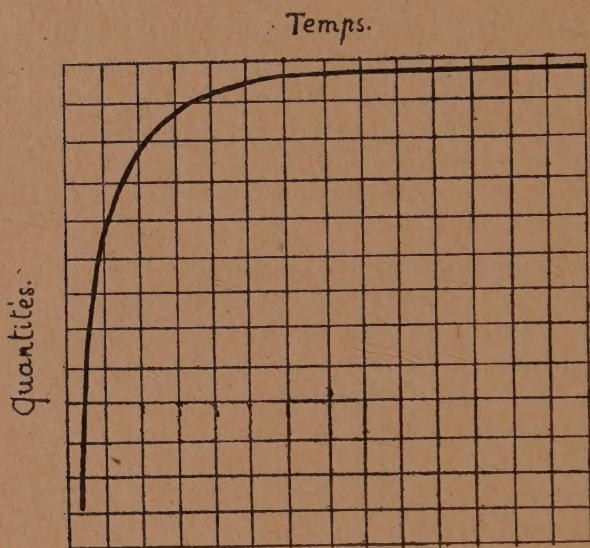
Nous indiquerons aussi à ce sujet que nous avons observé, dans nos expériences, les mêmes phénomènes que M. Duclaux a décrits dans ses recherches sur le lait. Avant l'action de la caséase sur la caséine, il se produit une coagulation de cette substance, probablement sous l'influence de présure que produit la mucédinée en même temps que la caséase, mais cette coagulation est variable suivant la quantité de diastase employée.

Emploie-t-on une quantité relativement faible de liquide diastasifère, il se produit un caillé homogène et gélatiniforme qui se dissout ensuite progressivement : c'est ce que nous avons observé en mélangeant 5 c. c. de liquide diastasifère actif à 25 c. c. de lait écrémé. Mais si l'on mélange le liquide diastasifère en de plus fortes proportions avec le lait, à parties égales par exemple, la coagulation se fait en petits grumeaux et peut passer inaperçue.

MÉLANGE DE 5 C. C. DE LIQUIDE DE CULTURE SUR BOUILLON PEPTONISÉ,
GLUCOSÉ ET DE 25 C. C. DE LAIT ÉCRÉMÉ (ÉTUVE A 40°)

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin.....	3 ^{gr} ,780	0 ^{gr}
Au bout de 2 heures.....	3,330	0,450
— 4 —	3,278	0,502
— 6 —	2,774	1,006
— 8 —	2,706	1,074
— 10 —	2,390	1,390
— 14 —	2,238	1,542
— 16 —	1,746	2,034
— 18 —	1,690	2,090
— 20 —	1,660	2,120
— 24 —	1,410	2,370
— 28 —	1,276	2,504
— 32 —	1,226	2,554
— 40 —	0,986	2,794
— 48 —	0,794	2,986
— 3 jours.....	0,531	3,229
— 4 —	0,478	3,302
— 5 —	0,380	3,400
— 6 —	0,347	3,433
— 8 —	0,331	3,449
— 18 —	0,331	3,449

Que l'on vienne à traduire ces résultats par une courbe, et l'on obtiendra le tracé ci-joint qui offre les allures d'une courbe exponentielle, asymptote à l'axe horizontal des temps, telle que celle qui représente l'action des diastases en général.



En mélangeant à parties égales le liquide diastasifère de notre mucédinée avec le lait écrémé, et en portant ce mélange à 40°, on trouve qu'après 5 heures les 9/10 de la caséine initiale ont été transformés, et qu'au bout de 9 heures l'équilibre que l'on constate à la fin des actions diastasiques est atteint.

IV. *Action du liquide diastasifère sur la gélatine.* — Dans ses travaux sur les levures, M. Boullanger¹ a montré que, pour ces microorganismes, le pouvoir liquéfiant vis-à-vis de la gélatine est en rapport avec la production de caséase, et l'on sait d'autre part que Fermi, dans ses études, confond la trypsine et la diastase liquéfiant la gélatine, de telle sorte que l'on peut se demander si la caséase, la diastase liquéfiant la gélatine et la trypsine doivent être confondues, ou s'il faut distinguer ces 3 diastases.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il est impossible de répondre à cette question, mais nous avons pensé qu'il n'était pas sans intérêt de rechercher comment se comporte vis-à-vis

1. BOULLANGER, ces *Annales*, 1897. p. 721.

de la gélatine le liquide diastasifère, riche en caséase, obtenu avec notre mucédinée qui dans ses cultures liquéfie rapidement la gélatine. Nos expériences à ce sujet nous ont conduit à des résultats analogues à ceux de M. Boullanger.

Plusieurs tubes contenant chacun 10 c. c. d'une solution de gélatine à 15 0/0 ont été stérilisés à l'autoclave : puis, après avoir attendu que la gélatine se soit refroidie, mais avant qu'elle se soit prise en masse, on a ajouté, au tube n° 1, 2 c. c. d'un liquide de culture sur bouillon, peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0, riche en caséase ; un autre tube, n° 2, a reçu 1 c. c. du même ; dans le tube n° 3 on a introduit 2 c. c. de liquide diastasifère chauffé préalablement à 100° afin de constituer un témoin.

Ces 3 tubes, après avoir été agités pour bien opérer le mélange de la diastase et de la gélatine, ont été refroidis rapidement jusqu'à ce que la gélatine ait fait prise. Enfin un tube n° 4 a été refroidi dans la position verticale, le niveau de la gélatine a été marqué à l'aide d'un index en papier, et l'on a versé dans ce tube 5 c. c. du liquide diastasifère. Tous ces tubes ont été portés dans une étuve à 20° ; au bout de 24 heures le tube n° 1 est complètement liquéfié ; la gélatine du tube n° 2 est ramollie, mais la liquéfaction n'est complète qu'au bout de 48 heures. Pour ces tubes, il est impossible de déterminer par refroidissement la solidification de la gélatine liquéfiée.

Dans le tube n° 4, où le liquide diastasifère n'est en contact avec la gélatine que sur une faible surface, la liquéfaction se produit aussi et progresse lentement. Elle est complète au bout de 35 jours.

Quant au tube n° 3 destiné à servir de témoin, la gélatine s'y est maintenue solide, les phénomènes observés dans les autres tubes sont donc bien dus à une action diastasique.

La même expérience a été reproduite avec d'autres liquides diastasiques provenant de cultures sur bouillon peptonisé et glucosé et de cultures sur lait, et les résultats ont été les mêmes, avec cette particularité toutefois que la liquéfaction de la gélatine s'est faite d'autant moins vite que le liquide diastasifère était moins riche en caséase.

On sait enfin que l'on a signalé l'action de la caséase sur d'autres albuminoïdes, ce qui nous a porté à expérimenter le liquide diastasifère de notre champignon sur l'albumine de l'œuf

coagulée et non coagulée, sur le sérum de bœuf et sur le sérum d'ascite. Dans divers essais, nous avons observé d'importantes modifications microscopiques sur le sérum de bœuf coagulé, qui se liquéfie lentement, et sur l'albumine coagulée, qui se transforme en une masse transparente et gélatiniforme, exhalant une odeur de peptones très nette; nous avons en outre noté dans tous les cas une diminution progressive de l'albumine existant au début de l'expérience, mais cette diminution s'est faite lentement et en faibles proportions. Nous nous contentons donc, pour le moment, de signaler ces particularités, nous réservant d'y revenir ultérieurement.

CONCLUSIONS

1^o La mucédinée parasite que l'un de nous a décrite sous le nom de forme *Oospora* du *Microsporum* du cheval produit, dans ses cultures, une diastase qui, comme la présure, coagule la caséine et une autre diastase qui dissout ce coagulum comme la caséase;

2^o La quantité de caséase existant dans le liquide de culture de cette mucédinée varie avec le milieu nutritif offert à la plante et avec l'état physiologique de celle-ci. Cette quantité de caséase nous a paru la plus grande dans les milieux neutres, peptonisés et glucosés, au moment où la totalité du glucose est consommée, et où la plante présente des phénomènes d'inanition et de désassimilation. Dans ces conditions, ce champignon peut être considéré comme un actif producteur de caséase;

3^o Le liquide diastasifère, contenant de la caséase, obtenu avec la forme *Oospora* du *Microsporum*, liquéfie la gélatine de telle sorte qu'il est impossible de la solidifier par refroidissement, et la liquéfaction de la gélatine est d'autant plus rapide que le liquide diastasifère est plus riche en caséase.

En outre le liquide diastasifère de la plante s'est montré actif vis-à-vis d'autres substances albuminoïdes : albumine de l'œuf, du sérum de boeuf, du sérum d'ascite.